

Erhard Jury

MAILLARD - REAKTION

BEITRAG ZUR KENNTNIS DER NICHTENZYMA-
TISCHEN BRÄUNUNGSREAKTION UNTER
BESONDERER BERÜCKSICHTIGUNG DES
5 - HYDROXYMETHYLFURFUOLS

Frankfurt am Main 1962



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41551911_0073

MAILLARD - REAKTION

Beitrag zur Kenntnis der
nichtenzymatischen Bräunungsreaktion unter
besonderer Berücksichtigung des
5-Hydroxymethylfurfurois

INAUGURAL - DISSERTATION

zur

Erlangung des Doktorgrades
der

Naturwissenschaftlichen Fakultät
der

Johann Wolfgang Goethe - Universität
zu

Frankfurt am Main

vorgelegt

von

Ernard J u r y

Nieder - Mohrau

Juni 1962

Gedruckt mit Genehmigung
der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der
Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main



Dekan: Prof.Dr. K.Egle
1. Gutachter: Prof.Dr.Dr. W.Diemair
2. Gutachter: Prof.Dr. Th.Wieland
Tag der mündlichen Prüfung: 20.7.1962
Tag der Promotion: 30.7.1962

Meinen lieben Eltern

Die vorliegende Arbeit wurde im Institut für
Lebensmittelchemie der Johann Wolfgang Goethe-
Universität zu Frankfurt am Main auf Anregung von
Herrn Prof.Dr. ing. et Dr. phil. W. D i e m a i r
ausgeführt.

Es sei mir erlaubt, an dieser Stelle meinem nochver-
ehrten Lehrer, Herrn Professor Dr.Dr. W. D i e m a i r ,
für die Übertragung der Arbeit und für seine wert-
vollen Ratschläge herzlichst zu danken.

Inhaltsverzeichnis

	Seite
<u>Allgemeine Einführung</u>	5
<u>Die MAILLARD Reaktion</u>	
I. Einführung	6
II. Nomenklatur	8
III. Reaktionsschema	9
N-substituierte Glykosylamine und ihre Amadori Produkte	9
Die Maillard Reaktion und ihre Endstufe	11
IV. <u>Experimenteller Teil</u>	
Darstellung von 5-Hydroxymethylfurfurol (HMF)	15
Reinigung der Reaktionsteilnehmer	15
Beständigkeit wässriger Aminosäure und 5-Hydroxymethylfurfurol-Lösungen	17
Bräunungsreaktionen	
Vergleichende Übersicht	18
Bräunung von 5-Hydroxymethylfurfurol	20
Bräunung von 5-Hydroxymethylfurfurol in Gegenwart von Kupfer	21
Vergleichende Bräunung individueller Aminosäuren mit Hexosen	22
Vergleichende Bräunung von Glykokoll mit Hexosen und ihren Umwandlungsprodukten	26
Vergleichende Bräunung von 5-Hydroxymethyl- furfurol mit individuellen Aminosäuren	27
Allgemeiner Einfluß von Metallspuren	28
Einfluß von Sauerstoff	34
Trennung und Nachweis der Reaktionsprodukte	36
Elektrophoretische Trennung	38
Papierchromatographische Trennung	41

	seite
Eigenschaften der Maillard-Reaktionsprodukte	48
Bildung von 5-Hydroxymethylfurfurol	52
Theoretische Deutung der Bildung von 5-Hydroxymethylfurfurol aus D-Glukose	53
Quantitative Bestimmung des 5-Hydroxymethyl- furfurols	55
Bildung von 5-Hydroxymethylfurfurol aus Hexosen in Gegenwart	
verschiedener Puffersysteme	58
individueller Aminosäuren	60
unterschiedlicher Acidität	62
verschiedener Aminosäurekonzentration (am Beispiel der L-Glutaminsäure)	62
Mechanismen und kinetische Studien	67
Allgemeine Einführung in das Reaktionsschema	68
Quantitative Stickstoffbestimmung nach van Slyke	74
Experimentelle Durchführung der Methode	77
Vergleich der Reaktionsfähigkeit der untersuchten Carbonylverbindungen	93
Einfluß von Natriumhydrogensulfit auf die Bräunungsreaktion	97
Vergleich der Reaktionsgeschwindigkeit und der Bräunungsgeschwindigkeit	98
Die Bedeutung von 5-Hydroxymethylfurfurol für die nichtenzymatische Bräunungsreaktion	99
V. <u>Zusammenfassung</u>	103
VI. <u>Literaturverzeichnis</u>	109

I. Einführung

=====

Louis Maillard wies erstmalig im Jahre 1912 auf eine Reaktion hin, die bei Hitzebehandlung von Aminosäuren und reduzierenden Zuckern zu braungefärbten Verbindungen führt und daher den Namen Bräunungsreaktion trägt. Die dabei auftretenden gelb- bis schwarzbraunen Umsetzungsprodukte sind komplexer Natur und weisen zum grössten Teil keine Protein- oder Zuckereigenschaften mehr auf.

Reaktionskinetische, analytische sowie physiologisch-chemische Gesichtspunkte geben immer wieder Veranlassung, die Wechselwirkung beider Komponenten - auch nach ihrem Entdecker "Maillard-Reaktion" genannt - zum Gegenstand von Untersuchungen zu machen.

Studien dieser Art beanspruchen schon deswegen unser Interesse, weil die Bräunungsreaktion durch ihre Beteiligung bei der Huminsäurebildung wohl zu den im grössten Ausmass in der Natur ablaufenden Vorgängen gehört (Vermoderung, Torfbildung). Aus praktischen Gründen ist man ausserdem bemüht, eine Klärung der nichtenzymatischen Bräunungsvorgänge herbeizuführen, da sie überall dort von Wichtigkeit sind, wo Eiweisstoffe und Zucker einer thermischen Behandlung ausgesetzt sind. Da die Mehrzahl unserer Nahrungsmittel Proteine und reduzierende Zucker nebeneinander enthalten und eine Erhitzung häufig nicht zu vermeiden ist, muss in vielen Fällen mit dem Auftreten einer Maillard Reaktion gerechnet werden.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, innerhalb der Maillard Reaktion die Veränderung von Aminosäuren und reduzierenden Zuckern in saurem Milieu aufzuklären, Bräunungsvorgänge zu studieren und reaktionskinetische Betrachtungen einiger Umsetzungen anzustellen.

Eine genaue, aber umständliche Beschreibung der Reaktion, die im folgenden diskutiert werden wird, mußte etwa lauten: "Primarreaktion zwischen der glykosidischen Gruppe eines Zuckers oder der Aldehydgruppe seiner Furanverbindung und der Aminokomponente einer Aminosäure". Diese genaue Definition ist berechtigt, wenn man bedenkt, daß Sekundärreaktionen eintreten können, die von anderen Stellen der beiden Moleküle ihren Ausgang nehmen.

L. M a i l l a r d (1) studierte als erster an einigen Modeliversuchen, die nach ihm benannte Braunungsreaktion. Er fand, daß einfache Aminosäuren beim Erwärmen mit bestimmten Zuckern dunkelbraune Verbindungen liefern. Dies erklärt, warum diese Reaktion in der Folgezeit in der Literatur als "Bräunungsreaktion, nichtenzymatische Bräunung, Melanoidinbildung oder Karamelisierung" bezeichnet wurde, während man die braunen Reaktionsprodukte ihrerseits in der Folge als Melanoidine, huminähnliche Substanzen, Aterine oder gar Orpneine benannte.

Da diese Bezeichnungen als chemisch uneinheitlich und ungenau anzusehen sind, soll unter der Maillard Reaktion in der folgenden Betrachtung die Umsetzung der Amino-Gruppe von Aminosäuren, Peptiden oder Proteinen mit der glykosidischen Hydroxylgruppe von Zuckern oder der Carbonylgruppe ihrer Umwandlungsprodukte verstanden werden.

Louis Maillard wurde 1878 geboren. Er studierte Pharmazie und Medizin. 1904 habilitierte er sich an der Medizinischen Fakultät in Paris, 1919 wurde er als Professor an den Lehrstuhl für Biologie und physiologische Chemie an die Universität von Algier gerufen. Neben seinen Arbeiten über die Bräunungsreaktion, die seinen Namen trägt, machte er wichtige Entdeckungen auf dem Gebiet der Proteine des Harnstoffstoffwechsels und des Titans. Seine Arbeit über Peptidsynthesen in Gegenwart von Alkoholen führte ihn dazu, Glycerin und später Zucker zu verwenden. Dabei beobachtete er das Auftreten von braungefärbten Komplexen. Er starb 1936 unerwartet in Paris.

Dieser definierten ersten Reaktionsstufe folgen komplizierte, in ihrem Mechanismus noch nicht aufgeklärte Reaktionen, nach. Sie führen zu Verbindungen komplexer Art, zu braunen Pigmenten und Polymeren. Trotz des in neuerer Zeit umfangreich erschienenen Schrifttums liegen keine schlüssigen Angaben über den Verlauf der theoretisch wie praktisch gleichwertigen Umsetzung vor. Dies mag in erster Linie darauf zurückzuführen sein, daß die Maillard Reaktion keinen einheitlichen Prozeß darstellt, sondern eine ganze Reihe verwickelter, von den Milieubedingungen stark abhängiger und deshalb schwer überschaubarer Vorgänge umfaßt.

Die große Bedeutung der Maillard Reaktion veranlaßte in den letzten Jahren zahlreiche Publikationen. Neben der bereits erwähnten Bildung der Huminsäure (2) in der Natur, tritt sie bei der mehr oder weniger intensiven Wärmebehandlung von Nahrungsmitteln auf. Hierbei kann es zur Bildung durchaus erwünschter Substanzen kommen, denkt man dabei an das Aroma von frisch gebackenem Brot oder von geröstetem Kaffee. Viel häufiger aber treten unerwünschte Veränderungen von Farbe, Geruch und Geschmack auf. Damit ist oft eine Beeinträchtigung des Eiweißgehaltes verbunden, da durch irreversible Reaktionen die Aminosäuren neben Kohlenhydraten blockiert und umgesetzt werden und in ernährungsphysiologischer Hinsicht durch Bildung von enzymresistenten Komplexen verloren gehen. Die Bedeutung der Reaktion wurde sowohl bei der Haltbarmachung von Nahrungsmitteln zu verschiedenen Malen (3-8) erkannt als auch bei der analytischen Bestimmung von Aminosäuren und Kohlenhydraten herangezogen (9-11).

Weitere Veröffentlichungen beschäftigen sich mit dem Einfluß von Reaktionsprodukten auf das Wachstum von Bakterien. Während für das verstärkte Wachstum von *Lactobacillus gaironii* in einer ernetzten Kulturlösung die Bildung von N-D-Glukosylglycin (12) verantwortlich gemacht wird, wird das des *Lactobacillus bulgaricus* 09 durch das Reaktionsprodukt von Lactose und Proteinen oder be-

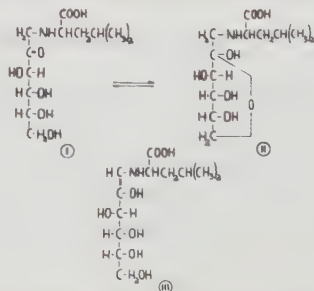
stimmt Aminosäuren verzögert (13). In ähnlicher Weise wirkt das Umsetzungsprodukt von Glycin und D-Glucose toxisch auf *phytophthora fragariae* (14).

II. Nomenklatur

Im deutschsprachigen Schrifttum ist die Benennung von Maillard Reaktionsprodukten nicht einheitlich. Es erscheint zweckmäßig, kurz auf das (nach B e i l s t e i n) gepflogene Abkommen der Namensgebung einzugehen und es an einem Beispiel aufzuzeigen.

Ist die Strukturformel der Verbindung bekannt, so wird auch hier bei der Namensgebung in Anlehnung an das oben Gesagte verfahren. Die Amadori-Umlagerungsprodukte erfahren keine besondere Benennung; in der Systematik würde das Amadori-Produkt von z.B. N-D-Glukosyl-DL-Leucin folgerichtigerweise als 1- (DL-1-Carboxy isopentylamino) -1- (desoxy-D-fructose) (I oder II) benannt werden. Dieser Name steht nicht mit der Forderung im Einklang, daß die Carboxylgruppe Vorrang besitzt und der Name daher auf "Säure" enden sollte. Konsequenterweise darf man diese Verbindung N- (D-Arabino-tetrahydroxy-2-oxohexyl) -DL-Leucin benennen. Ein kürzerer und eindeutig gleicher Name wäre N-[-D-Fruktosyl-(1)/-DL-leucin.

(Es soll nicht unerwähnt bleiben, daß man solche Reaktionsprodukte auch Fruktose-Leucin genannt hat. Dies kann aber zu Verwechslungen mit solchen Ausdrücken wie "Fruktose-Leucin-System" (15) führen.)



Die Verbindung III bezeichnet man dann als Enolform von N- (D-Fruktosyl- (1)) -DL-leucin.

III. Einteilung der Reaktion

Bei der Wechselwirkung von Aminosäuren und Zuckern kann man zwei allgemeine Reaktionstypen unterscheiden.

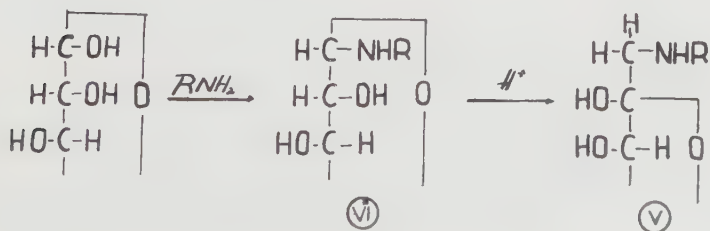
Zur ersten zählt die einfache, kontrollierte Kondensation der beiden Reaktionspartner; sie führt zu Verbindungen, die als N-Substituierte Glykosylverbindungen oder gelegentlich als ihre Amadori-Umlagerungsprodukte identifiziert wurden.

Unter die zweite fällt die typische Maillard Reaktion. Diese stellt keinen einheitlichen Prozeß dar, sondern führt zu einer Reihe komplexer Produkte, deren Bildung von den Milieubedingungen stark abhängt und deshalb schwer überschaubar ist.

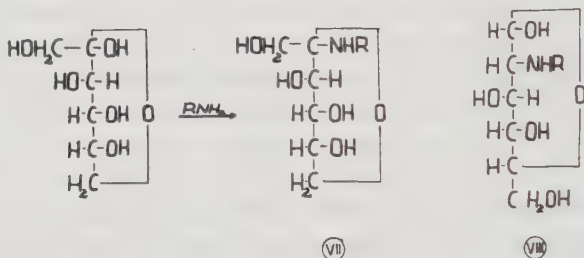
N-Substituierte Glykosylamine und Amadori Produkte

Erhitzt man Aldosen in Methanol (16), Äthanol (16) oder Wasser (17) mit Verbindungen, die eine primäre Amino-Gruppe enthalten, so gewinnt man Glykosylamine (VI); durch Hinzufügen von Äther zur Reaktionslösung oder beim Abkühlen derselben, fällt das Reaktionsprodukt kristallin an. Gelegentlich wirkt Ammoniumchlorid (18) oder Chlorwasserstoff (19) als Katalysator besonders, wenn die Aminoverbindung eine schwache Base darstellt. Ist die Wasserstoffionenkonzentration zu hoch, so kann sich die Glykosylverbindung (20) zu dem (21) 1-Amino-1-Desoxy-2-Ketose-derivat umlagern (Amadori-Umlagerung). (V). Nach G.P. Ellis und J. H o n e y m a n (22-29) kann die An- oder Abwesenheit von Wasser in der Reaktionslösung dafür verantwortlich gemacht werden, welche Isomeren auskristallisieren.

Der Reaktionsverlauf darf wie folgt angesehen werden:



Ketosen reagieren mit aliphatischen Aminoverbindungen leichter (24-25) als mit aromatischen (25). Die gebildeten Ketosylamine (VII) können eine Umlagerung in Form einer reversiblen Amadori Umlagerung erfahren. Man erhält so als Reaktionsprodukt von D-Fruktose und einem Amin eine 2 -Amino-2-Desoxy -D-Glukose (Glukosamin VIII). (25). Es gelang nicht immer, das D-Fruktosylderivat (VII) zu isolieren.



Das Formelbild (VII) zeigt die α -Konfiguration des D-Fruktosylamins; es ist gleichermaßen erlaubt, die β -Konfiguration in den Projektionsformeln zu verwenden.

Aldosen wurden mit einer großen Zahl von Aminosäuren und ihren Estern zu N-substituierten Glykosylaminen kondensiert. So gab z.B. die Glukose die entsprechenden N-D-Glukosylderivate von m-, o-, und p-Aminobenzoesäure (27), von p-Aminosalicylsäure (28), Glycin, Lysin und Serin. Dabei zeigten *Ågren* und *Taylor* (29), daß das Vorliegen einer intakten Carboxylgruppe die Reaktion der Aminoverbindung mit der D-Glukose hemmt. Die Reaktion zwischen einer DL-Aminosäure und einer Aldose wurde auch herangezogen, um die Stereoisomeren auf Grund ihrer verschiedenen Löslichkeit (30) aufzutrennen.

Im folgenden sei kurz auf die Reaktionsbedingungen einiger N-substituierter Glykosylamine eingegangen.

Läßt man β -D-Glukosylfluorid und eine Aminosäure in wässrigem Medium bei einem pH 7-8 einige Zeit stehen, so kann nach *Michaels* und *A. Kierner* (31) das Natriumsalz der N-D-Glukosylaminosäure als amorphes Pulver isoliert werden.

hierbei ist kein Katalysator notwendig. D-Glukose und DL-Phenylalanin in absolutem Methanol am Rückfluß erhitzt, geben als Hauptprodukt die Amadori-Umlagerungsverbindung, die 1[-Desoxy-1-Phenylalano]-D-Fruktose (32). Der gleiche Reaktionstyp wird auch von einigen anderen Aminosäuren gegeben (33,34,35).

Die Ausbeuten dieser Umsetzungen sind meist gering, und da man das Produkt selten in kristalliner Form erhält, ist es auch nach den konventionellen Methoden nur schwer zu reinigen. Man verwendet daher häufig Ionenaustauscher (34). Eine kristalline Verbindung erhielt man (36), wenn der Isopropylester des Glycins und 4, 6-o-Benzyliden-D-Glukose eingesetzt wurden. Benutzt man N,N-Dimethylformamid als Lösungsmittel, wird in manchen Fällen die Ausbeute erhöht (37).

Obgleich große Anstrengungen unternommen wurden, die Struktur der N-substituierten Glykosylamine aufzuklären, gelang es bislang nicht, eine sichere Beweisführung für deren Molekulaufbau zu erbringen (20). Nach F. L e g a y ist die spektroskopische Beweisführung (38) nicht zwingend; auch die chemischen Methoden sind wegen des möglichen Gleichgewichtes zwischen der offenkettigen und cyclischen Form des Moleküls (Pyranosen, Furanosen) nur von begrenztem Wert.

Jedoch zeigen alle bisher bekannten Derivate, die als Ester oder Äther direkt aus den N-Glykosylaminen erhalten wurden, die p y r a n o i d e Form und die Perjodat-Oxydation einiger N-Glykosylamine haben diese Aussage bestätigt (39).

Die Maillard Reaktion

Die Reaktionsbedingungen, welche von Zuckern und Aminen oder Aminosäuren zu N-substituierten Glykosylaminen führen, sind hinlänglich bekannt und wohl definiert. Diejenigen, unter denen eine Maillard Reaktion abläuft, können dagegen stark variiert werden. Auf diese Variablen, Temperatur, Konzentration und pH wird noch in dieser Arbeit eingegangen werden, ebenso auf die vergleichende Reaktivität individueller Aminosäuren und Zucker.

Je nach den verschiedenen Produkten, die isoliert wurden, konnte man mehrere Stufen der Maillard-Reaktion unterscheiden. Mit wachsender Reaktionsdauer stieg die Ausbeute an komplexen Verbindungen an und im späteren Verlauf der Reaktion erhält man dunkel- bis schwarzbraune, unlösliche, polymere Umsetzungsprodukte.

Die Maillard Reaktion wurde unter verschiedenen Gesichtspunkten betrachtet und diese fanden ihren Ausdruck in den voneinander abweichenden Definitionen obiger Umsetzung. So sind einige Autoren der Ansicht, daß ein *Zerfall*, andere, daß eine *Polymerisation* des Zuckers unter Einbeziehung der Aminosäuren die Reaktion auslöst (10,40,41,42).

Erhitzt man in einem Sauerstoffstrom bei 130° C eine Aminosäure mit D-Glukose, so tritt nach angeführter Gleichung eine Decarboxylierung und Desaminierung ein.



Dabei setzt sich das freiwerdende NH_3 schnell mit der Aldose um, so daß nur geringe Mengen an freiem Ammoniak nachgewiesen werden können. Die Reaktion ist irreversibel und verläuft bei einem pH = 9,2 schneller als bei pH = 11,9 (43,44). Die stärkste Bräunung tritt im allgemeinen auf, wenn das Verhältnis von Aminosäure zu Zucker bei ungefähr 1:2 liegt (40,41). Bei hohen Temperaturen liegt der Anteil an Zucker pro Mol Aminosäure noch höher (45).

Kürzlich wurde von L.F.L.J. *Anet* eine Verbindung (46) beschrieben, bei welcher zwei Moleküle Zucker auf jedes Molekül Glycin kommen. Wurde das Na-Salz des Glycins bei 100° C mit einem Überschuß an D-Glukose oder D-Mannose zwölf Minuten lang erhitzt, so erhielt man eine 20 %ige Ausbeute.

M.L. *Wolfram* und Mitarbeiter haben bei der Darstellung von Melanoidinen (47) einen Überschuß an Aminosäuren verwendet, aber kinetische Studien ließen vermuten, daß die erste Stufe der Reaktion vom aquimolekularem Verhältnis beider Reaktionsteilnehmer ausgeht.

Der Elson - Morgan Test (40) für Hexosamine wird auch von den Produkten der Maillard-Reaktion (49) gegeben. Da gelegentlich freie Zucker, Aminosäuren und Hexosamine nebeneinander in Proteinhydrolysaten vorkommen, ist es von Interesse, Hexosamine in Gegenwart von D-Glukose und solchen Aminosäuren, wie Lysin oder Glycin, nachzuweisen. Horowitz, Ikawa und Fling (50) konnten nämlich zeigen, daß D-Glukose, D-Fruktose, D-Galaktose, L-Sorbose, L-Fruktose und L-Xylose Umwandlungsprodukte bilden, die positiv auf das Elson-Morgan Reagens ansprechen.

In späteren Arbeiten gelang die Unterscheidung beider Reaktionen (17,51). Gibt die unbekannte Verbindung eine rote Farbe mit dem Ehrlich's Reagens (p-Dimethylaminobenzaldehyd in HCL), nachdem sie mit einer Lösung von Na_2CO_3 versetzt wurde, so liegt ein Zucker-Aminosäurekomplex vor (D-Glukosamin gibt unter diesen Bedingungen keine Färbung). Das pH-Optimum der Farbreaktion für D-Glukosamine liegt bei 9,5, bei Zucker-Aminosäureverbindungen dagegen bei 10,8 - 11,2.

Auch die Absorptionsmaxima unterscheiden sich deutlich voneinander. Dasjenige des Glukosamins und dem Ehrlich Reagens liegt bei 530 nm und wandert beim Stehenlassen zu kleineren Wellenlängen, während die korrespondierende rote Farbe der Maillard Reaktion zwei definierte Maxima, bei 570 und 510 nm, aufweist.

Die Endstufe der Maillard Reaktion

Die Melanoidine, im allgemeinen stark braungefärbte amorphe Substanzen, stellen das Endprodukt der Maillard Reaktion dar. Die Isolierung dieser Substanz aus der Reaktionslösung ist einfach.

Maillard (52,53,54) beobachtete als erster das Entstehen von festen Reaktionsprodukten, als er D-Glukose und andere reduzierende Zucker mit Glycin und anderen Aminosäuren bei Temperaturen von 34°, 40°, 100° und 150° erhitzte.

Es schließt sich eine kurze Versuchsbeschreibung dieser historischen Versuche an.

"Eine Mischung von feingepulverter D-Glukose (4 g., 0,02 mol), Glycin (1 g., 0,0013 mol) und Wasser (3 - 4 ml) wurde in einem Wasserbad erhitzt. Die Lösung war am Anfang neilgelb gefärbt, wurde jedoch mit zunehmender Erhitzungsdauer schnell dunkelbraun und viskos. Entstehende Gasblasen erzeugten einen Schaum auf der Oberfläche und als Endprodukt der Umsetzung erhielt man eine schwammige, voluminöse Masse glänzender brauner Tafeln.

Durch Hinzufügen geringer Mengen Wassers konnte man das Auftreten von Gasblasen beobachten. Das Endprodukt bestand aus einem amorphen Pulver. Wurde ein ähnlicher Versuch bei 40° ausgeführt, blieb die Farbe der Lösung lange Zeit unverändert. Erst nach 27 Stunden wurde sie hellgelb, nach 44 Stunden orange; nach 68 Stunden, die Lösung hatte inzwischen eine klare braune Färbung angenommen, zeigten sich die ersten Gasblasen; die Lösung schäumte, und nach 110 Stunden fielen feste Reaktionsprodukte aus.

Bei einer Temperatur von 34° vergingen 204 Stunden, bevor die Lösung eine dunkelbraune Farbe annahm; bei 150° dagegen verlief die Gas- und Farbbildung außerordentlich rasch."

Erhitzt man bei 170° einen Überschuß von Glycin mit D-Glukose in wässrigem Medium, so bildet sich bald ein dunkelbrauner, fester Überzug auf der Oberfläche der Lösung. Dieser wurde mit Wasser gekocht und die entstandene Suspension filtriert. Im Filtrat konnte Glycin nachgewiesen werden. E n d e r s und T h e i s (55) arbeiteten mit einem Unterschluß an Glycin und erhielten auf ähnliche Art Melanoidine. Auch T a n , W o l f - r o m und L a n g e r (56) erhielten eine braune amorphe Masse, wenn sie D-Xylose und Glycin in aquimolekularen Mengen oder im Molverhältnis 0,1:1 bei 95° zwischen 20 und 90 Stunden erhitzten. Das so erhaltene braune Pigment wurde durch Dialyse gereinigt und durch anschließendes Zentrifugieren abgetrennt.

W o l f r o m , C a v a l i e r i und C a v a l i e r i (57) stellten unter definierten Bedingungen (Säuregrad, Konzentration) bei 90 - 95° ebenso "Muster" von Melanoidinen her und verwendeten diese als Farostandards für Vergleichsmessungen. Die Farbintensität dieser Lösungen wurde bei 490 nm gemessen.

IV. Experimenteller Teil

Darstellung von 5-Hydroxymethylfurfuroi (HMF)

Das Verfahren von Kiermeier (58) wurde modifiziert. 3 kg Saccharose werden in 3 l heißem Wasser gelöst und durch Zugabe von Oxalsäure auf pH 2,5 eingestellt. Man erhitzt die Lösung in einem Autoklav (Drucktopf) eine Stunde bei 140°, läßt abkühlen, befreit eventuell die schwarzbraune Lösung von Unlöslichem und neutralisiert mit gepulvertem CaCO₃. Das starke Schäumen der Lösung wird durch Zugabe einiger Tropfen eines Siliconöls unterbunden. Es wird vom Unlöslichen abfiltriert und das entstandene HMF mit Essigsäureäthylester ausgeschüttelt. Das Ausschütteln wird dreimal wiederholt (es ist zweckmäßig, sich hierbei eines Vibromischers zu bedienen). Durch Zentrifugieren trennt man die organische Phase ab und befreit unter Vakuum vom Lösungsmittel. Es bleibt eine sirupöse, gelbbraune Flüssigkeit zurück. Diese wird im Tiefrühlschrank (- 14°C), gegebenenfalls durch Impfen mit HMF, zur Kristallisation gebracht. Der entstandene braune Kristallkuchen wird auf einem Tonteller abgedrückt, in Äther aufgenommen und nach Hinzufügen von wenig Petroläther wiederum in der Kälte auskristallisieren gelassen. Letztere Prozedur wird noch ein- bis zweimal wiederholt. Es fallen gelblichweiße lange Nadeln an (Fp.: 31,5° C -Schmelzpunktapparat nach Kofler-; Phenylhydrazinderivat Fp.: 139° aus Benzol). Das UV-Adsorptionsspektrum ist mit dem in der Literatur angegebenen identisch. Die Ausbeute beträgt 35 g.

Reinigung der verwendeten Reagenzien

In seiner Arbeit über die Bräunung von evaporierter Milch, erkannte W e d b (59) als erster die Bedeutung einiger Schwermetallkationen. Er beobachtete, daß sich Lactoselösungen beim Erwärmen in Gegenwart von geringen Mengen an Cu⁺⁺ und Fe⁺⁺⁺ schneller als kationenfreie Vergleichslosungen bräunten.

Wie eine qualitative Überprüfung einiger käuflicher Aminosäuren, reduzierender Zucker und des HMF ergab, enthielten diese Produkte wechselnde Mengen an mehrwertigen Kationen. (Cu, Fe, Zn, Al). Diese wurden auf folgendem Wege entfernt:

Aminosäurereinigung

Man kristallisiert die Aminosäure aus heißem, bidestilliertem Wasser unter kurzem Aufkochen mit Tierkohle und anschließendem Abfiltrieren, um. Die noch heiße Lösung wird in einen Schütteltrichter übergeführt und mit Ammonium-Pyrrolidindithiocarbaminat versetzt (3 ml Carbamat-Lösung auf 100 ml zu reinigende Lösung) und heftig geschüttelt. Die entstehenden Metall-Chelate färben die Lösung gelblichbraun. Durch wiederholtes Zugabe einiger ml von Chloroform (p.a.) und erneutes Umschütteln, werden sowohl die Metall-Komplexverbindungen als auch das überschüssige Carbaminat aus der Aminosäurelösung entfernt. Wie eine Versuchsprobe zeigt, bleibt die Lösung nun auf erneute Zugabe von Carbaminatlösung farblos. In der sich nun abkühlenden Lösung kristallisiert die gereinigte Aminosäure aus oder kann durch Einengen der Lösung aus dieser gewonnen werden. Auf ähnliche Art wurden dabei verwendete Glasgeräte gereinigt.

Reinigung von 5-Hydroxymethylfurfurol, D-Glukose und D-Fruktose

Die kristalline Substanz wird in wenig Wasser gelöst und mit einigen Tropfen der Ammonium-t-Carbatlösung versetzt. Man mischt innig (Schütteltrichter) und durch wiederholtes Zugabe einiger ml Chloroform (p.a.) und Umschütteln, reinigt man die Lösung von den gebildeten Metall-Chelaten und der überschüssigen Reagenslösung.

Um das mühevollen Auskristallisieren zu umgehen, ist es geboten, die Lösungen obengenannter Substanzen direkt als Reaktionskomponenten zu verwenden.

Die Reinigung der Reagenzien mit Hilfe von Ammonium-Pyrrolidindithiocarbaminat (nach Gieu kurz Ammonium-t-Carbat genannt) ist deswegen geeignet, weil diese Verbindung mit der Mehrzahl der Metalle sehr stabile Chelate bildet. Diese, sowie das Reagens

lassen sich mit Chloroform quantitativ ausschütteln und stören daher nicht weiter. Kupferron wirkt ebenso wie Dithizon nur auf einige Metalle (z.B. Edelmetalle) selektiv unter Chelatbildung ein; beide wurden daher nicht zur Reinigung verwendet.

Untersuchungen über die Beständigkeit wässriger Aminosäure- und Hydroxymethylfurfurol-Lösungen

Will man etwas über Bräunungsreaktionen aussagen oder gar kinetische Studien über den Reaktionsverlauf anstellen, dann müssen die Reaktionspartner in wohlbekannter und definierter Form vorliegen.

Aus diesem Grunde wurden die verwendeten Aminosäuren und das HMF je einzeln in Testversuchen auf ihre Beständigkeit geprüft. Die Variablen, wie Temperatur, Acidität und Reaktionszeit, wurden denen der Versuchsreaktion angeglichen. Mit Hilfe der Papierchromatographie, der UV-Spektroskopie und der Tüpfelanalyse wurden die Testlösungen auf ihre Veränderlichkeit überprüft und dabei folgendes festgestellt:

Die untersuchten Aminosäuren

DL-Alanin, DL-Valin, DL-Serin, L-Leucin
DL-Phenylalanin, DL-Tryptophan,
L-Tyrosin, L-Asparaginsäure,
L-Glutaminsäure, L-Lysin und
L-Histidin

erleiden in einem Temperaturintervall von 30 - 90° C und einem pH Bereich von 2,0 - 6,0 während 50 Stunden keine Veränderung ihrer Molekülstruktur.

Es ist bekannt, daß das Hydroxymethylfurfurol (HMF) in saurer Lösung in Ameisensäure und Ävulinsäure zerfällt (62). Mit C 14 markierten Hexosen gelang der Nachweis, daß das C-Atom der Ameisensäure und das C₁-Atom der Hexose identisch ist.

In einer anderen Arbeit^{*)} wurde ausführlich über die Beständigkeit wässriger HMF Lösungen in Abhängigkeit von Temperatur und Acidität berichtet.

Aus den unternommenen Testversuchen geht klar hervor, daß in einem Temperaturintervall zwischen 30 und 70° C und einem pH-Bereich von 3,0 - 4,5 während 30 Stunden k e i n e Zerfallsprodukte von HMF auftreten. Eine leichte Verfärbung der Lösung nach gelb läßt uns vermuten, daß eine beginnende Kondensation der HMF-Moleküle eintritt, die zu farbigen Verbindungen führt (Stabilisation).

Moderne Anschauungen (63) weisen darauf hin, daß Verbindungen, die mindestens 6 - 8 linear konjugierte Doppelbindungen enthalten, im sichtbaren Spektralbereich absorbieren.

Braunungsreaktionen

Man unterscheidet zwischen e n z y m a t i s c h e n und n i c h t e n z y m a t i s c h e n Braunungsreaktionen. Die erstere beruht auf dem Vornandensein von A s c o r b i n - s ä u r e und verwandten Substanzen (64). Diese liefern durch Oxydation reaktive Produkte, welche unter Polymerisierung oder auch in Reaktionen mit stickstoffhaltigen Verbindungen zu braunen Pigmenten führen.

Die enzymatische Braunungsreaktion sei von unseren Betrachtungen ausgenommen und im Verlaufe der vorliegenden Arbeit nicht berücksichtigt.

Die Startreaktion zwischen Aminosäuren und reduzierenden Zuckern liefert N-Glykosylaminosäuren. Diese ersten Kondensationsprodukte sind im allgemeinen farblos und entstehen dann, wenn die definierten Reaktionsbedingungen genau eingehalten werden (65, 31, 66, 32). Im Gegensatz dazu treten in Folgereaktionen braungefärbte Verbindungen auf, deren Bildungsmöglichkeit nur auf die Anwesenheit beider Reaktionsteilnehmer beschränkt ist.

^{*)} Diplomarbeit: W. Diemair und E. Jury

Im folgenden Abschnitt soll auf einige Charakteristika der Maillard Reaktion eingegangen werden.

Das offensichtliche Zeichen ist das Auftreten von gelben und braunen, wasserlöslichen Verbindungen. Diese werden mit zunehmender Zeit schnell dunkler und wasserunlöslich (52). Es liegt nahe (da die Glykosylamine farblos sind), die Farbvertiefung der Lösung messend zu verfolgen, um damit ein Maß der Reaktionsgeschwindigkeit zu erhalten (vergleiche mit Aussagen der Tab. 1 und 2). Obige Eigenschaft wurde auch von verschiedenen Autoren herangezogen (56,68,69,70), und die optische Dichte einer Lösung (gewöhnlich bei 420 oder 490 nm) in Abhängigkeit von der Zeit gemessen. Neben der Verfärbung ist die CO_2 -Entwicklung (schon von Maillard 1912 beobachtet und beschrieben) ein weiteres Charakteristikum der Zucker-Aminosäure-Reaktion. Erst in jüngerer Zeit wurde diese Beobachtung mit der Farbvertiefung in Beziehung gebracht und ausgewertet (67,70). Dem steht jedoch entgegen, daß in verdünnten Aminosäuren und Zuckern keine CO_2 Entwicklung beobachtet werden konnte (71).

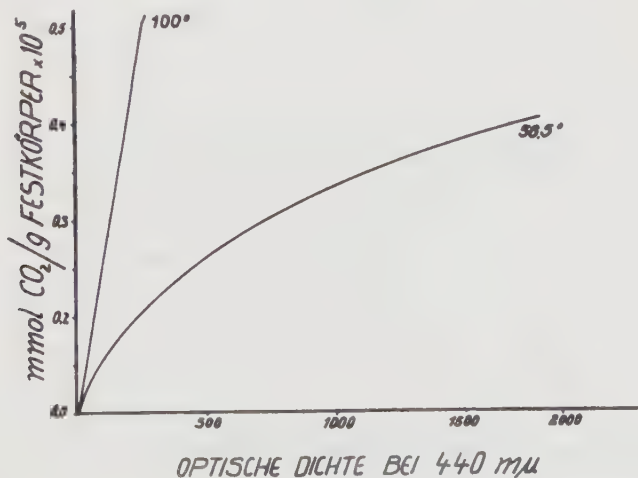


Abb. 1:

CO_2 -Entwicklung und Pigmentbildung einer wässrigen D-Glukose (2,4 mol) und Glykokoll - Lösung (1 mol) bei 100° und 56,5° C.

Aminosäuren und reduzierende Zucker stellen die beiden Reaktionspartner der Maillard Reaktion. Wenn, wie schon erwähnt, die Aminosäuren für sich keine Veränderung in saurem Milieu bei Wärmeeinwirkung erleiden, so sind die Zucker davon ausgenommen. Diese bilden in Abhängigkeit von ihrer Konzentration der Acidität und der Reaktionstemperatur wechselnde Mengen an HMF. Das Entstehen dieser Verbindungen wird in einem späteren Kapitel besprochen. Im folgenden wird der Nachweis erbracht, daß die Bräunung nicht nur auf die Reaktion von Aminosäuren und Zucker beschränkt ist. Selbst reine HMF-Lösungen vermögen braungefärbte Pigmente zu bilden. Aus diesem Grunde ist eine exakte Aussage über die Reaktionsgeschwindigkeit mit Hilfe der Farbvertiefung in saurem Medium nicht möglich.

Tab.: 1 Bräunung von 5-Hydroxymethylfurfurol

Zeit (Std.)	% Transmission					
	Säuregrad (pH)					
	0,9	1,9	3,0	4,0	5,0	6,0
6	11 ⁺	23	100	100	100	100
10	-	14	100	100	100	100
14	-	12 ⁺	98	100	100	100
18	-	6 ⁺	73	92	99	100
22	-	5 ⁺	65	88	96	100
24	-	5 ⁺	58	85	95	100

Je 0,1 mol. wässrige (bidest. H₂O) HMF Lösungen werden bei 70° C im Trockenschrank erhitzt und ihre Transmission bei 420 nm im Lumetron Colorimeter gemessen.

Tab.: 2 Bräunung von 5-Hydroxymethylfurfurol in
Gegenwart von Kupferspuren

Zeit (St)	% Transmission							
	Säuregrad (pH Anfang)							
	2,3	2,3*	3,3	3,2*	4,3	4,3*	6,6	6,6*
1	-	-	100	100	100	100	100	100
41/2	66	83	99	99	99	99	99	99
9	67	67	98	94	100	96	100	100
26	23	19	70	67	80	75	80	78
48	9	5	45	31	58	47	52	48
	2,0	2,0	3,4	3,3	3,6	3,7	4,2	4,2
	Säuregrad (pH Ende)							

*) Diese Lösungen enthalten $1,0 \times 10^{-5}$ g an Cu^{++} (s. Tab. 2)

Ergebnis:

Aus den versuchsergebnissen geht hervor, daß reine HMF Lösungen in saurem Milieu gelb bis gelblichbraune Verbindungen unbekannter Zusammensetzung ergeben. Je größer die Acidität der Lösung, um so stärker ist die eintretende Verfärbung; bei einem pH unter 2,0 tritt bereits nach 5 Std. eine Pigmentbildung auf (+ s. Tab. 1). Die gleichen Aussagen gelten auch für die kupferhaltigen Testlösungen. Deren optische Dichte ist jedoch in allen Fällen g r ö ß e r als die der spurenfreien Vergleichslösung; d.h., die Anwesenheit von Kupfer b e s c h l e u n i g t die Braunfärbung.

Aus diesen Ergebnissen darf geschlossen werden, daß die Braunfärbung von Aminosäure-Zuckerlösungen auf zweierlei Reaktionen zurückzuführen ist: auf die eigentliche Maillard Reaktion und auf die Umwandlungsreaktion der Hexosen. Diese bilden in saurer Lösung HMF, das in Abhängigkeit vom Säuregrad und Zeit zu braungefärbten Produkten führt.

Im vorangegangenen Abschnitt wurde gezeigt, daß das HMF allein zur Bräunungsbildung befähigt ist. Hierbei konnten keine Spalt- oder Zersetzungsprodukte (Methylglyoxal, Dihydroxyaceton, Lävulinsäure und Ameisensäure) nachgewiesen werden. Es darf daher angenommen werden, daß sich die HMF-Moleküle durch Polymerisation stabilisieren, wodurch eine gleichzeitige Pigmentbildung eintritt.

vergleichende Bräunung individueller Aminosäuren mit Hexosen

Nach den vorausgegangenen Untersuchungen soll im folgenden Abschnitt auf das Bräunungsvermögen wässriger Aminosäuren und Zuckerlösungen eingegangen werden.

Die Abbildung 2 gibt einen Überblick über den Durchlaßgrad (%-Transmission) wässriger D-Fruktose und D-Glukoselösungen sowie verschiedener Aminosäuren.

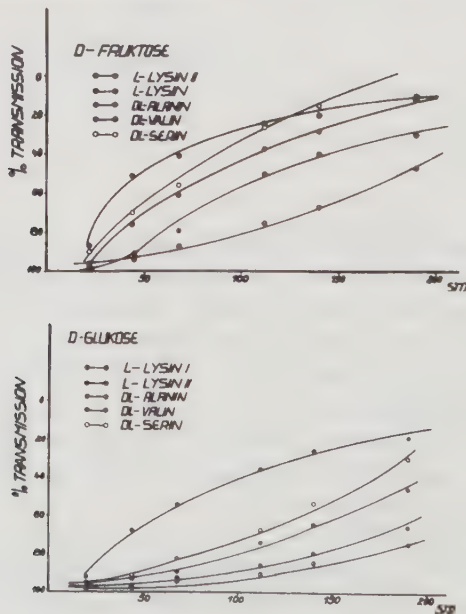


Abb. 2: Bräunungsgeschwindigkeit individueller Aminosäuren

Bei 70° C werden 0,1 mol. Lösungen von D-Glukose und D-Fruktose und verschiedenen Aminosäuren erhitzt und ihre Transmission bei 420 nm im Lumetron Colorimeter gemessen. Als Blindlösung diente eine reine 0,1 molare D-Glukose bzw. D-Fruktoselösung.

Tab.: 3 Veränderung der Acidität

Amino- säure	D-Glukose		D-Fruktose	
	pH			
	Zeit (St)			
	20	190	20	190
DL-Alanin	4,8	4,2	4,8	4,1
DL-Valin	4,8	4,2	4,8	4,3
DL-Serin	4,7	3,5	4,7	3,5
L-Lysin I	4,6	3,9	4,5	3,8
L-Lysin III	6,2	3,9	6,3	3,9

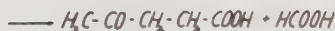
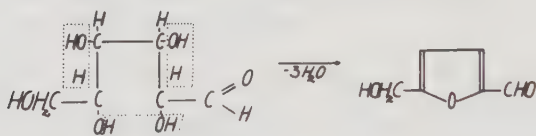
Ergebnis:

Nach einer Induktionsperiode treten in äquimolekularen Lösungen von D-Glukose, D-Fruktose und verschiedenen Aminosäuren Farbvertiefungen nach gelb und braun auf. In allen Versuchslösungen steigt die Acidität an. Der Durchlaßgrad ist in jedem Fruktose-Aminosäuregemisch g e r i n g e r als in vergleichbaren Glukose-Aminosäurelösungen.

Unter gleichen Reaktionsbedingungen bräunt von den individuell verwendeten Aminosäuren S e r i n am stärksten, gefolgt von L-L y s i n, DL-A l a n i n und DL-V a l i n. Die Abbildung 2 zeigt, daß bei der basischen Aminosäure L y s i n der Grad der Bräunung bei pH 6,2 beträchtlich höher ist als bei pH 4,6.

Die gemessene Farbvertiefung ist proportional der Reaktionszeit.

Eingangs wurde erwähnt, daß nur in s a u e r e m Medium die Maillard Reaktion zum Gegenstand unserer Untersuchung gemacht werden soll. Dank dieser Einschränkung ist es möglich, den Weg der beiden Reaktionspartner im Verlauf der Reaktion zu verfolgen. Während die Aminosäuren in saurer Lösung absolut beständig sind, verhalten sich auch die Zucker im allgemeinen gegen Säuren, besonders verdünnte, stabil. Erst bei hohen Säurekonzentrationen oder bei höherer Temperatur treten tiefergehende Umwandlungen im Molekül ein. Diese führen unter Wasseraustritt über das wohldefinierte HMF ($C_6H_6O_3$) weiter zu Lävulinsäure und Ameisensäure.

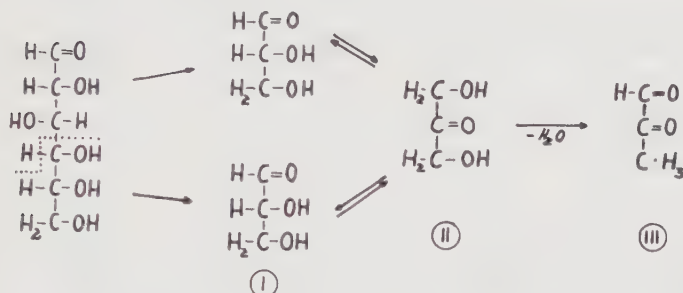


Von diesen Umwandlungsprodukten ist für die Maillard Reaktion lediglich das Hydroxymethylfurfurol mit seiner aktiven Aldehydgruppe von großer Bedeutung. Ameisensäure und Lävulinsäure selbst reagieren n i c h t mit Aminosäuren.

Verdünntes Alkali dagegen kann schon beträchtliche Strukturänderungen im Molekül der freien Zucker hervorrufen. Die Wirkung ist zunächst eine isomerisierende; man erhält aus D-Glukose z.T. die D-Mannose und z.T. die D-Fruktose. Diese Isomerisierung unter Umwandlung an den C-Atomen 1 und 2 wurde zuerst von L o b r y D e B r u y n und v a n E k e n s t e i n untersucht (72). Es entstehen dabei die "Epimeren"; daneben findet noch die Isomerisierung Aldose ===== Ketose statt.

Wesentlich tiefergehend sind die Veränderungen, denen das Zuckermolekül bei Verwendung von stärkerem Alkali oder von höherer Temperatur unterliegt.

Außerlich sind diese Umwandlungen an der starken Gelbfärbung zu erkennen, die Zucker mit verdünntem Alkali in der Wärme oder mit konzentrierterem schon in der Kälte erleiden. Bei diesen Umwandlungen läßt sich ein bevorzugter Zerfall der Hexosen in Verbindungen mit drei Kohlenstoffatomen feststellen.



Wahrscheinlich zerfallen die Hexosen zunächst in zwei Moleküle einer Triose: Glycerinaldehyd (I) und Dioxyaceton (II), die sich in Gegenwart des Alkalis leicht ineinander umwandeln, und weiterhin unter Wasserabspaltung in Methylglyoxal (III) übergehen (73).

Da diese angeführten Zerfallsprodukte nur in alkalischen Milieu gebildet werden, braucht nicht näher auf sie eingegangen zu werden. Trotzdem ist es interessant, sie neben Hexosen und ihrem Denhydratationsprodukt, dem HMF, auf ihr Bräunungsvermögen zu prüfen.

Tab.: 4 Vergleichende Bräunungsgeschwindigkeit von Glykokoll mit Hexosen und ihren Umwandlungsprodukten

	% Transmission				
	Zeit (Min)				
	160	200	260	320	1400
D-Glukose	99	99	98	98	96
D-Fruktose	100	99	99	96	94
5-Hydroxymethylfurfurol	89	84	80	77	59
Dioxyaceton	83	73	55	41	8
Methylglyoxal	26*	24*	20*	19*	15*

Je ein mol. Lösungen an Glykokoll und Zuckerkomponente werden bei 40° C im Wasserbad erwärmt und ihre Transmission bei 465 nm in Abhängigkeit von der Zeit im Lumetron Colorimeter gemessen. Der pH der Lösung betrug 3,7.

*) Hierbei fallen wasserunlösliche braungefärbte Pigmente an, welche vor der Messung abfiltriert werden.

Ergebnis:

Unter den gleichen Reaktionsbedingungen bräunen die bei der alkalischen Spaltung von Hexosen auftretenden Produkte, wie Methylglyoxal und Dioxyaceton mit Glykokoll am stärksten. Dabei bilden sich schon nach 90 min wasserunlösliche Verbindungen (Methylglyoxal); beide Lösungen nehmen nach 20 St. eine dunkelbraune bzw. dunkelrotbraune Färbung an.

Im Gegensatz dazu erleiden die Hexosen-Aminosäurelösungen nahezu keine sichtbaren Farbveränderungen (nur die Fruktoselösung ist sehr schwach gelb gefärbt). Das HMF steht in dieser vergleichenden Übersicht des Bräunungsvermögens verschiedener Hexosen und ihren Umwandlungsprodukten etwa in der Mitte. Daraus geht hervor, daß in saurem Milieu die Bräunung in erster Linie auf eine Reaktion zwischen Aminosäuren und dem Umwandlungsprodukt aus reduzierenden Zuckern (HMF) zurückzuführen ist, wobei letztere selbst braun-gefärbte Komplexe bilden können.

Es ist zu prüfen, in welchem Maß reine HMF-Lösungen mit individuellen Aminosäuren beim Erwärmen eine Bräunung der Reaktionslösung hervorrufen.

Tab.: 5 Vergleichende Bräunungsgeschwindigkeit von
p-Hydroxymethylfurfural und individuellen
Aminosäuren

Aminosäure	Extinktion $\times 10^{-2}$						
	pH Anf.	Zeit (Std.)					pH Ende
		31	95	111	127	152	
DL-Alanin	5,4	0,5	0,7	0,8	1,0	1,6	4,5
DL-Valin	5,4	0,5	0,6	0,7	1,0	1,3	4,8
DL-Serin	5,1	0,8	1,2	1,5	2,0	2,6	4,6
L-Cystin	4,6	2,2	9,4	15,4	20,5	29,6	3,5
DL-Phenylalanin	4,8	0,5	1,8	2,0	4,0	5,1	3,8
L-Tyrosin	5,0	1,0	3,0	4,5	6,0	7,3	4,6
L-Prolin	5,5	0,7	2,1	3,0	4,9	11,0	5,5
DL-Tryptophan	4,8	20,0	43,0	-	-	-	4,0
L-Asparaginsäure	3,0	0,3	4,9	7,6	12,0	18,0	2,9
L-Glutaminsäure	3,1	0,3	3,4	5,4	8,6	12,1	2,8
L-Lysin	5,0	1,0	3,7	4,3	5,0	5,7	5,0
L-Arginin	5,3	0,5	2,2	1,1	3,3	4,2	5,1
L-Histidin	3,6	3,0	10,7	15,0	19,5	25,6	3,4

Wässrige Lösungen mit je 0,01 mol. Konzentrationen an HMF und der betreffenden Aminosäure werden bei 70,4° C im Trockenschrank erhitzt und ihre Extinktion im Elko gemessen (Filter : S45/E56; Küvettendurchmesser 1 cm). Als Blindlösung diente eine 0,01 mol. den gleichen Reaktionsbedingungen ausgesetzte HMF-Lösung.

Ergebnis:

Mit Ausnahme des Lysins nimmt in allen Versuchsungen die Acidität mit steigender Reaktionsdauer zu. Während die Zunahme des Säuregrads bei den verwendeten basischen und sauren Aminosäuren im Mittel 0,1 - 0,2 pH-Einheiten beträgt, steigt sie bei den neutralen auf 0,8 - 1,0 pH-Einheiten an.

Alle Testlösungen verfärben sich nach gelb, gelbbraun bis dunkelbraun (Tryptophan).

Das Bräunungsvermögen der neutralen Aminosäuren steigt von DL-Valin, DL-Alanin, DL-Serin, DL-Phenylalanin, L-Tyrosin, L-Prolin, L-Cystin zu DL-Tryptophan an. Dabei fällt auf, daß die aromatischen Aminosäuren, mit Ausnahme des Cystins, schneller als die aliphatischen bräunen. Erstere lassen sich im Hinblick auf ihr Bräunungsverhalten mit HMF noch einmal unterscheiden. Diejenigen aromatischen Aminosäuren, welche an Stelle des Benzolrings oder zusätzlich zu diesem einen heterocyclischen Fünfring enthalten (Prolin und Tryptophan), zeigen unter den gegebenen Reaktionsbedingungen eine stärkere Verfärbung der Lösung.

Von den beiden sauren Vertretern der aliphatischen Monoamino-carbonsäuren, der Asparagin- und Glutaminsäure, bräunt die erstere stärker; beide jedoch übertreffen die beiden aliphatischen Vertreter der basischen Aminosäuren, wie Lysin und Arginin. Das ebenfalls basische Histidin mit seinem Imidazolring dagegen bräunt neben Tryptophan und Cystin vor allen anderen Aminosäuren am stärksten.

Zusammenfassend geht aus den Versuchsergebnissen hervor, daß neben dem HMF die sauren Aminosäuren und vor allem diejenigen, welche einen Imidazol-, Pyrrol- oder Pyrrolidinring im Molekül enthalten, die Bräunungsbildung begünstigen.

Einfluß von Metallspuren

Auf die Bedeutung geringer Metallspuren im Hinblick auf die Maillard Reaktion wurde 1935 zum ersten mal von Webb (59) in seiner Arbeit über die Verfärbung von evaporierter Milch hingewiesen.

Er fand, daß sich Lactose Lösungen bei 49° bei Anwesenheit von Kupfer und Eisen schneller bräunten; Spuren von Zinn wirkten dagegen hemmend.

Geringe Mengen von Kupfersalzen beschleunigen ähnlich die Bräunung von Aminosäuren oder Proteinen mit D-Glukose in schwach alkalischen Lösungen (74). Rosen, Johnson und Pigman (75) fanden dagegen keinen bedeutenden Unterschied in der Bräunung von verdünnten methanolischen Lösungen von N-Phenyl- D-Glucosamin und 0,08 n Salzsäurekonzentration bei An- oder Abwesenheit von 0,1 % Kupferionen. Deschreider (76,77) kommt auf Grund einer Arbeit über die Bräunung von ernitzten D-Glukose-Dicksäften mit Aminosäuren zu dem Ergebnis, daß bei einem pH 3,25 oder 5,20 die Bräunung und der Verlust an Amino-Stickstoff durch Spuren von Kupfer, Eisen oder Zink gar gehemmt werden.

Jedoch war bei diesem Versuch die Aminosäurekonzentration (Glycin, DL-Alanin oder Asparaginsäure) ungewöhnlich niedrig und betrug nur 75 bis 225 ppm. Kupfer lag als Kupfersulfat vor; seine Konzentration betrug 10 bis 40 ppm. Spektroskopische Untersuchungen ergaben auch hier die Anwesenheit von HMF, dessen Konzentration parallel der Farbtintensität verlief.

Zu Beginn dieses Kapitels wurde anhand von Testversuchen nachgewiesen, daß die Bräunungsintensität reiner HMF-Lösungen bei Anwesenheit von Kupferspuren größer ist als in spurenfreien.

Nachfolgende Tabelle gibt einen Überblick über die Fähigkeit verschiedener Ionen, die bei der Maillard Reaktion auftretende Dunkelfärbung zu beschleunigen oder zu nehmen.

Tab.: 6 Unterschiedliche Wirkung verschiedener Ionen bei der Bräunungsreaktion

Ionenkonzentration (5 x 10 ⁻⁴ mol/l)	pH Anf.	% Transmission				pH Ende
		Zeit (Min)				
		210	530	1520	1850	
Mg ⁺⁺ (So ₄)	3,7	89	41	6	6 ⁺	3,6
Mn ⁺⁺ (So ₃)	3,7	90	42	6	6 ⁺	3,6
Cu ⁺⁺ (Cl ₂)	3,7	82	35	6 ⁺	4 ⁺	3,6
Fe ⁺⁺ (So ₄)	3,7	81	34	7 ⁺	4 ⁺	3,7
Fe ⁺⁺⁺ (Cl ₃)	3,7	90	39	8 ⁺	6 ⁺	3,7
Sn ⁺⁺ (Cl ₂)	3,4	87	60	27 ⁺	20 ⁺	3,4
TiO ⁺⁺ (SO ₄)	3,5	81	55	26 ⁺	19 ⁺	3,5
HSo ₃ ⁻	3,7	100	85	40	28	3,7
H ₂ PO ₄	3,7	90	47	1	6 ⁺	3,6
HMF/A.S. rein	3,7	88	51	10 ⁺	8 ⁺	3,7
HMF rein	3,4	97	78	23	19	3,4

Aquimolekulare Lösungen (0,1 mol) von L-Glutaminsäure und HmF werden bei 72,5° C im Trockenschrank erhitzt und ihre Transmission bei 420 nm in Abhängigkeit von der Zeit im Lumetron Colorimeter gemessen.

Die Konzentration der Ionen beträgt 5×10^{-4} mol/l.

*) In diesen Lösungen bildeten sich wasserunlösliche Farbpigmente, die durch vorausgehende Filtration entiernt wurden.

Ergebnis:

Vorliegende Versuchsergebnisse lassen erkennen, daß die Anwesenheit von Ionen die Bräunung von Aminosäure-HmF-Lösungen beschleunigen und hemmen kann.

Bei einer Ionenkonzentration von 3×10^{-3} mol/l wirken eindeutig als kationen Mangan, Magnesium, Kupfer, Eisen (als Fe^{++} und Fe^{+++}) und als Anion das primäre Ammoniumphosphat beschleunigend auf den Bräunungsvorgang ein. Diese kationen kamen als Salze in Form ihrer Sulfate (Mg, Mn, Fe) oder Chloride (Cu, Fe) zur Anwendung.

Zinn-II-chlorid und Titanylsulfat dagegen hemmten die Bräunungsreaktion ebenso wie Natriumsulfat.

Die unterschiedliche Wirkung der verwendeten Ionen läßt sich nicht in befriedigender Weise deuten.

Das Vorhandensein von Natriumhydrogensulfit neben HMF führt zweifellos zu dessen Additionsprodukt, das in dieser Form nicht mehr zur Bräunungsbildung befähigt ist.

Wie zu Beginn dieses Abschnitts gezeigt wurde, beschleunigen Spuren von Kupferionen bereits die Pigmentbildung reiner HMF-Lösungen. Man wird daher in vorliegendem Fall zwischen einer HMF und einer HMF-Aminosäurebräunung zu unterscheiden haben. Neben der ersteren, die sich in saurerer Lösung immer einstellt, und deren Intensität durch die Kationen (siehe folgende Tabelle) katalysiert wird, läuft aber auch die mit der Aminosäure einher. Wie aus der Tabelle ersichtlich, trägt diese zur Bräunung unter den angegebenen Bedingungen wesentlich weniger bei als die erste.

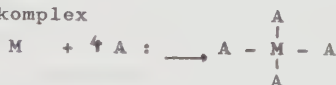
Versucht man, die katalytische Wirkung der Metallionen für das Braunwerden von Aminosäuren-HMF-Lösungen zu erklären, so ist folgende Annahme erlaubt:

Aminosäuren sind Chelatbildner.

Verbindet sich ein Metallion mit einem Elektronendonator, so bezeichnet man die dabei entstehende Substanz als Koordinationsverbindung. Enthält die mit dem Metallion reagierende Substanz zwei oder mehr Gruppen mit Donatoreigenschaften, so daß bei der Reaktion ein oder mehrere Ringe gebildet werden, dann nennt man die resultierende Molekel eine Chelatverbindung.

Schema:

I Metallkomplex



M = Metallion

A = Komplexbildner

A-A = Chelatbildner

II Metallchelate



Die Aminosäuremoleküle erfüllen als Träger von mindestens zwei funktionellen Gruppen (Amino- und Carboxylgruppe) diese Voraussetzung. Denn nur die ausgesprochen nichtmetallischen Elemente der V und VI Gruppe des Periodensystems, überwiegend Stickstoff, Sauerstoff und Schwefel, treten als Donatoratome, die die Bindung mit dem Metall eingehen, auf. Auf der anderen Seite bildet die Mehrzahl der Metalle im Periodensystem Koordinationsverbindungen und Chelate. Besonders die Übergangsmetalle ergeben eine Vielzahl solcher Verbindungen (78,79,80).

Aufgrund dieser Überlegungen kann daher angenommen werden, daß die aus der Tabelle ersichtlichen Metallionen zumindest mit der Aminosäurekomponente "komplexartige" Verbindungen eingehen, die nun leichter mit HMF zu braungefärbten Produkten weiterreagieren können.

Es ist nicht ausgeschlossen, daß das HMF oder erste Kondensationsprodukte ebenso wie die Aminosäure als Chelatbildner fungieren kann. Eine kürzlich erschienene Mitteilung von G. W e i t z e l und Mitarbeitern (81) wies darauf hin, daß N-Glykosylamine mit Metallen Komplexe bilden, welche für den Ablauf der Maillard Reaktion von Bedeutung sein können.

Wenn in diesem Abschnitt über die hemmende und beschleunigende Wirkung einiger Metallionen berichtet wurde, so wurde hier die Frage, in welcher K o n z e n t r a t i o n eine optimale Farbvertiefung auftritt, nicht diskutiert.

G.S. B o h a r t und J.R. C a r s o n berichten in ihrer Arbeit (82), daß Eisenionen in einem phosphatgepurierten D-Glukose - Glycinsystem bei 50° die Reaktion um das vier- bis fünffache beschleunigen, daß aber Mangan (Mn^{++} 0,4 ppm) die Farbintensität von 17 auf 24 % vermindert. Selbst bei einer Mangankonzentration von 0,003 ppm konnte noch eine deutlich wahrnehmbar inhibierende Wirkung festgestellt werden; lagen 2 ppm vor, so zeigten die Vergleichslösungen, daß hierbei eine Farbaufhellung von 30 auf 40 % eintrat. Bei all diesen Testversuchen lag ein kleiner Überschuß an Glycin vor. Wurden die Versuche in verschlossenen Kolben unter Stickstoffatmosphäre ausgeführt, so zeigte hierbei das Mangan k e i n e inhibierende Wirkung.

Eigene Versuche mit wechselnden Metallkonzentrationen in einer Asparaginsäure-HMF-Lösung führten zu folgendem Ergebnis:

Tab.: 7 Auswirkung verschiedener Kationskonzentrationen auf die Bräunungsgeschwindigkeit einer äquimolekularen Glutaminsäure-HMF-Lösung

Ionenkonzentration mol/l	pH Anf.	% Extinktion			pH Ende	
		Zeit (St)				
		13	21	38		
Fe ⁺⁺	1,0 x 10 ⁻³	3,7	12	5	2 ⁺	3,6
	1,0 x 10 ⁻⁴	3,7	25	10	5 ⁺	3,7
	1,0 x 10 ⁻⁵	3,7	31	12	6 ⁺	3,7
Cu ⁺⁺	1,0 x 10 ⁻³	3,7	15	6	3 ⁺	3,6
	1,0 x 10 ⁻⁴	3,7	24	9	6 ⁺	3,6
	1,0 x 10 ⁻⁵	3,7	29	10	6 ⁺	3,7
Sn ⁺⁺	1,0 x 10 ⁻³	3,7	54	40	26 ⁺	3,6
	1,0 x 10 ⁻⁴	3,7	40	25	18 ⁺	3,7
	1,0 x 10 ⁻⁵	3,7	34	14	8 ⁺	3,7

Äquimolekulare Lösungen (0,1 mol) von L-Glutaminsäure und HMF werden bei 72,6° C im Trockenschrank erhitzt und ihre Transmission bei 420 nm in Abhängigkeit von der Zeit im Lumetron Colorimeter gemessen.

+) In diesen Lösungen traten wasserunlösliche braune Farbpigmente auf, die bei der Intensitätsmessung durch vorausgehende Filtration entfernt wurden.

Ergebnis:

Die L-Glutaminsäure-HMF-Lösung wurde mit wechselnden Mengen an Kupfer, Eisen und Zinn versetzt (CuCl₂, SnCl₂, FeSO₄; letzteres wird durch Sauerstoff teilweise in die dreiwertige Stufe oxidiert). Die Konzentration der verwendeten Kationen betrug jeweils 1,0 x 10⁻³, 1,0 x 10⁻⁴ und 1,0 x 10⁻⁵ mol/l.

In allen Testversuchen konnte festgestellt werden, daß mit steigender Metallionenkonzentration die Farbintensität stärker zunimmt (Fe^{++} , Cu^{++}) oder, wie ein Vergleich mit spurenfreien Kontroll-Lösungen zeigt, gehemmt wird (Sn^{++}). Selbst bei Ionenkonzentrationen von 1×10^{-5} mol/l ist noch eine wahrnehmbare Farbvertiefung bzw. Farbaufhellung zu beobachten.

Je größer die Ionenkonzentration ist, um so augenscheinlicher sind die Intensitätsabweichungen.

So setzt Zinn ($1,0 \times 10^{-3}$ mol/l) nach 13 Std. die Farbintensität von 32 auf 54 % herab, während Eisen und Kupfer unter den gleichen Bedingungen die Farbintensität auf 12 bzw. 15 % herunterdrücken.

Zusammenfassend geht aus diesen Ergebnissen hervor, daß neben der Wahl des Kations auch die Konzentration desselben für die Bräunungsreaktion von Bedeutung ist; so beschleunigen oder inhibieren größere Mengen an Metallionen stärker als geringe.

Diese Aussage steht mit der Annahme in Einklang, daß die Metallionen mit den Reaktanten chelatartige Verbindungen geben, die für den Bräunungsverlauf geschwindigkeitsbestimmend sein können.

Einfluß von Sauerstoff

Maillard (54) beobachtete, daß bei der Reaktion von Glycin mit D-Glukose Kohlendioxyd entsteht. Führt er die Versuche in Abwesenheit von Sauerstoff aus, so konnte er ebenso das Auftreten von Kohlendioxyd beobachten. Aus diesen und anderen Ergebnissen schloß er, daß das gebildete CO_2 aus einer Decarboxylierung der Aminosäure herrührt und, daß dem Sauerstoff bei der Reaktion keine Bedeutung zuerkannt wird.

Olcott und Dutton (83) fanden, daß D-Glukose und Glycin bei Gegenwart geringer Mengen Wasser unter Luft und Sauerstoff die gleichen Bräunungseigenschaften aufweisen wie im Hochvakuum. Ähnliche Aussagen erhält man beim Verfärben von N-Phenyl-D-Glukosylamin in verdünntem wässrigen Methanol bei 30°C (75) oder beim Lagern von getrockneten Gemüsen (84).

Wurden weiterhin Lösungen von D-Xylose-Glycin (oder Alanin) bei 100°C in offenem, geschlossenem Reaktionsgefäß und unter Stickstoffatmosphäre erhitzt, so konnte mit Hilfe der Lichtabsorption bei 450 nm kein Unterschied des Bräunungsverhaltens festgestellt werden (o5).

L e w i n (8o) jedoch fand meßbare Unterschiede bei der Reaktion von D-Glukose mit L-Histidin unter aeroben und anaeroben Bedingungen (siehe untenstehendes Bild).

Bei Sauerstoffanwesenheit konnte er beobachten, daß die Testlösungen sich nicht so schnell bräunten. Außerdem wuchs die pH-Abnahme bei aeroben Versuchen schneller an als bei anaeroben; aber dieser Unterschied wurde erst nach dem ersten "Haltepunkt" offenbar. Die Veriasser vermuten, daß durch eine mögliche Oxydation saure Produkte gebildet werden, die den stärkeren pH-Abfall erklären. Die Werte, die man für den pH-Abfall erhielt, waren unter anaeroben Bedingungen leichter reproduzierbar als unter aeroben. Dies wurde besonders in den späteren Stufen der Reaktion offenbar.

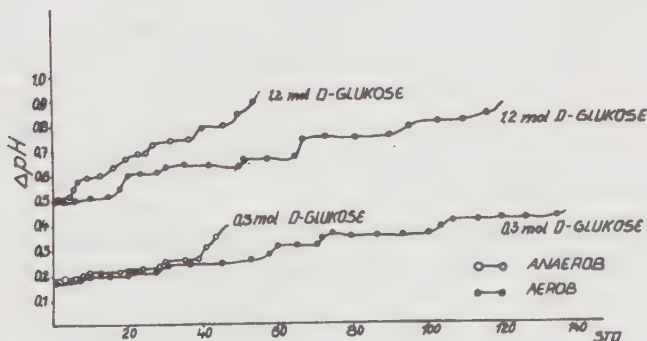


Abb. 3: Veränderungen der pH-Abnahme (pH) mit der Zeit in D-Glukose - L-Histidin-Lösungen bei 50°C (Histidinkonzentration 0,016 mol; anfangs pH 7,81 x Zeit in Stunden o---o anaer. ●---● aerob).

E i g e n e Versuche, die unter den gleichen Reaktionsbedingungen abliefern, konnten die von Leweis gemachten Aussagen bestätigen.

Zu ähnlichen Ergebnissen gelangte man, wenn man an Stelle des L-histidins Lysin (86), L-Glutaminsäure (86), DL-Alanin (87) und Glycin (87) verwendete.

Bei tiefer Temperatur und geringen Mengen an D-Glukose wurde kein Unterschied im pH-Abfall bei aeroben und anaeroben Versuchslösungen festgestellt. Erhöhte man dagegen die Konzentration der Reaktionsteilnehmer, so wurden die Unterschiede im pH-Abfall bei aeroben Versuchen ersichtlich größer, während bei anaeroben die Bräunung schneller fortschritt.

Der Mangel an Uniformität in den Ergebnissen verschiedener Arbeiten ist nicht so sehr überraschend, wenn man bedenkt, daß der Mechanismus der Bräunung und damit die Rolle der Ionen noch nicht geklärt und kleine Veränderungen der Reaktionsvariablen den Ablauf der Reaktion bereits sehr variieren können.

Zusammenfassung

Das vorliegende Kapitel berichtet über Bräunungsreaktionen. Als Reaktionspartner kommen individuelle Aminosäuren sowie D-Glukose, D-Fruktose und 5-Hydroxymethylfurfurol (HMF) zur Anwendung.

Die Farbintensität nimmt mit steigender Temperatur und Reaktionszeit zu.

Die Bildung braungefärbter, wasserunlöslicher Pigmente und das Absinken des pH steigt mit der Reaktionszeit an.

Die Bräunungsbildung tritt sowohl als Folgeerscheinung einer Aminosäure-Zucker-Reaktion, einer Aminosäure-HMF-Reaktion und einer HMF-HMF-Reaktion auf.

Bei einem Vergleich der Bräunungsgeschwindigkeit zwischen Glykokoll mit D-Glukose, D-Fruktose und HMF bräunt letzteres 6 mal so schnell als D-Fruktose und 6 mal so schnell als D-Glukose.

Die Farbintensität wässriger HMF-Lösungen steigt mit fallendem pH und wird durch Spuren von Kupferionen beschleunigt.

Aromatische neutrale Aminosäuren bräunen eine HMF-Lösung schneller als vergleichbare aliphatische Aminosäuren. Enthalten erstere neben dem Benzolring oder an dessen Stelle einen heterocyclischen Fünfring, wird diese Eigenschaft noch verstärkt. Ähnliches gilt von den basischen Aminosäuren.

Die Bräunungsgeschwindigkeit von L-Asparagin- und L-Glutaminsäure ist mit Ausnahme des basischen Histidins und des neutralen Cystins größer als die der anderen Aminoverbindungen.

Die längerkettige Glutaminsäure bräunt weniger stark als die Asparaginsäure.

Fremdionenzusätze wirken beschleunigend oder hemmend auf die Farbvertiefung wässriger L-Glutaminsäure-HMF-Lösungen ein.

Bei einer Ionenkonzentration von 3×10^{-5} mol beschleunigen Magnesium, Mangan, Kupfer, Eisen und primäres Phosphat die Reaktion, während sie Zinn, Titan und Hydrosulfit hemmen.

Die Farbvertiefung oder Aufhellung ist abhängig von der Konzentration des Fremdionenzusatzes.

Sie nimmt mit steigender Konzentration zu (Cu, Fe) oder ab (Sn).

In wässrigen Aminosäure-Zuckerlösungen (0,016 mol Histidin, 0,3 und 1,2 mol D-Glukose) ist die pH-Depression und die Bräunungsgeschwindigkeit von der Sauerstoffanwesenheit abhängig.

Unter aeroben Bedingungen nimmt die Acidität der Testlösung schneller ab als unter anaeroben; die Bräunungsgeschwindigkeit verhält sich entgegengesetzt dieser Aussage.

Trennung und Nachweis der beiden Reaktionspartner Glykokoll und 5-Hydroxymethylfurfurol und der entstandenen Maillard-Produkte

Elektrophoretische Trennung

Die Komplexbildung von Zuckern und anderen Polyhydroxylverbindungen ist schon seit langem bekannt. B o e s e k e n und M i c h l (86) gelang es nachzuweisen, daß diese Komplexe im elektrischen Feld zur Anode wandern.

Diese Beobachtungen waren nun der Ausgangspunkt für zahlreiche Arbeiten, die sich mit der elektrophoretischen Auftrennung verschiedener Substanzgemische beschäftigten.

Zur Auftrennung wurde die von W i e l a n d und P f i e i d e r e r (89) entwickelte Hochspannungselektrophoreseapparatur verwendet. Es gelangte bei allen Versuchen Glasfaserpapier vom Typ Whatman GF/c, in Bogen von etwa 40 x 25 cm, zur Anwendung. Dieses verhindert als indifferentes Trägermaterial eine mögliche Adsorption der aufzutrennenden Komponenten an dem neutralen Träger.

Durch orientierende Versuche wurde festgestellt, daß bei Verwendung einer Boratpufferlösung (pH 5) eine relativ gute Auftrennung möglich ist.

Wässrige Lösungen von Glykokoll und HMF (1,0 mol Glykokoll; 5,0 mol HMF) werden bei 40° C 20 Stunden lang bei einem Anfangs-pH von 3,1, 4,1 und 6,5 erhitzt und die entstandene schwarzbraune Reaktionslösung der elektrophoretischen Trennung unterworfen.

Zu diesem Zweck mischt man die Reaktionslösung mit dem Boratpuffer und trägt mit Hilfe einer Kapillare die zu trennende Lösung punkt- bzw. strichförmig am Startpunkt auf. Es ist darauf zu achten, daß die zu trennenden Komponenten in nicht zu großer Konzentration vorliegen.

Ergebnis:

Bei einer Spannung von 2.200 Volt und einer Stromstärke von etwa 90 mA war deutlich eine Auftrennung der aufgetragenen Lösung im Laufe von 30 Minuten zu beobachten. Wird die Spannung erniedrigt, so erhält man bei größerem Stromdurchfluß eine schnellere Wanderungsgeschwindigkeit. Eine genauere Auftrennung wird jedoch dabei nicht erzielt.

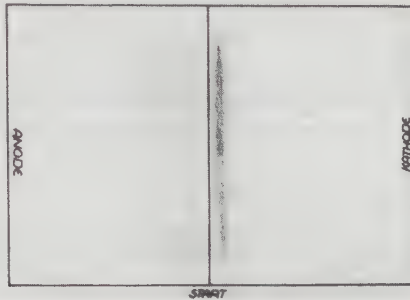


Abb.: 4 Elektropherogramm einer erhitzten Glykokoll-HMF-Lösung

Aus Abbildung 4 ist rein visuell und ohne Anwendung von Nachweisreagenzien eine Auftrennung der braunen Farblösung im elektrischen Feld in verschiedene Zonen zu erkennen.

Die Hauptmenge des braunen Farbpigments wandert bei kleiner Wanderungsgeschwindigkeit in Richtung Kathode, angeführt von einer schwach wahrnehmbaren rotgefärbten Farbkomponente. Diese beiden Zonen sind deutlich voneinander differenziert. Zur Anode wandert bei größerer Wanderungsgeschwindigkeit ein ockerbraunes Farbband. Man erkennt dabei zwei dunklere Zonen in der Nähe des Startpunktes und eine schwach gelb gefärbte gegen Ende des Bandes in Richtung Anode.

Kommen Reaktionslösungen mit einer verschiedenen Anfangsacidität zur elektrophoretischen Auftrennung, so zeigt das entstehende Pherogramm doch i m m e r das gleiche Bild.

Um aber auch ungefärbte Substanzen mit zu erfassen, wurde das Pherogramm angefärbt. Als Sprühmittel wurden verwendet:

Elson Morgan Reagens (4c)

Anilinphtalat (1,66 g-Phtalsäure + 0,93 g
Anilin in 100 ml wasserges.
Butanol; bespr. und 10 min.
auf 105° C erhitzt)

Ninhydrin (0,2 % äthan. Lösung)

Tillmanns Reagens (0,08 g Dichlorphenol-indophenol
in 200 ml 50 % wäss. Athanol)

Zur besseren Identifizierung des Pherogramms werden reine Testlösungen von HMF und Glykokoll mit aufgetrennt.

Das Elson Morgan Reagens spricht nicht an.

Mit Anilinphtalat gelingt der Nachweis von HMF. Als hellziegelroter Ring umgibt es die Hauptmenge des braunen Farbpigments, welches zur Kathode wandert.

Ninhydrin zeigt zwei blaue Farbzonen im Pherogramm an. Die eine, sehr schwach sichtbar, weist, wie ein Vergleich mit der Testlösung zeigt, auf reines Glykokoll hin; die Zone liegt zwischen dem braunen Farbpigment und dem HMF und wird teilweise von ihnen überdeckt. Die andere Zone liegt auf der Anodenseite des Pherogramms. Sie ist violett gefärbt, verschmiert und erstreckt sich zwischen den beiden dunkleren Zonen des ockerbraunen Farbbandes.

Mit dem Nachweisreagens auf Reduktone von Tillmanns erhält man auf beiden Seiten des Startpunktes eine F a r b a u f h e l - l u n g .

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen lassen erkennen, daß eine exakte Auftrennung der untersuchten Glykokoll-HMF-Lösung nicht möglich ist. Wohl gelingt eine Teilauftrennung in verschiedenen braungefärbte Zonen und auch der Nachweis einer Verbindung (violett-verschmierte Zone), die auf Ninhydrin anspricht.

Allgemein ist jedoch die Trennwirkung dieser Untersuchungsmethode so gering, daß sie nicht geeignet ist, für weitere Untersuchungen herangezogen zu werden.

Papierchromatographische Trennung

In den letzten Jahren haben die chromatographischen Verfahren die klassischen chemischen Methoden der Auftrennung und Isolierung fast vollständig verdrängt, so daß diese nur noch zu Identitätsbeweisen herangezogen werden.

Bei den hier vorzunehmenden Untersuchungen handelt es sich darum, entstandene Reaktionsprodukte einer Aminosäure-HMF-Modell-Lösung aufzufinden und zu trennen.

Eine wässrige Lösung von Glykokoll und HMF (1,0 mol Glykokoll; 5,0 mol HMF; pH 3,30 ; 6,4) wird bei 40° C 20 Std. lang in einem Thermostaten erhitzt. Die entstandene schwarzbraune Reaktionslösung wird anschließend chromatographisch aufgetrennt.

Weder die Säulenchromatographie noch die eindimensional aufsteigende oder absteigende Trennmethode konnte bei breiter Variierung von Trägermaterial stabiler und mobiler Phase befriedigende Ergebnisse bringen.

Das Entwickeln der Chromatogramme erfolgte mit Ninhydrin, Anilinphtalat, Tillmanns Reagens, Metaperjodat und alkalischer Silbernitratlösung.

Das Haltoarmachen von Ninhydrinkomplexen mit Hilfe von Kupfer-II-Ionen dient nicht zur besseren Unterscheidung und Sichtbarmachung entstandener Farverbindungen; von ihrer Verwendung wird daher abgesehen.

Ergebnis:

Zweidimensional aufsteigende Trennung.

Als Lösungsmittel diente ein Gemisch von n-Butanol - Äthanol - Wasser im Verhältnis 40 : 11 : 19 und als zweites ein solches von n-Butanol : Dimethylformamid : Wasser zu 2 : 1 : 1.

Mit diesen Gemischen konnte nach einer Laufzeit von 20 bzw. 2 Std. eine gute Trennung der einzelnen Verbindungen erreicht werden.

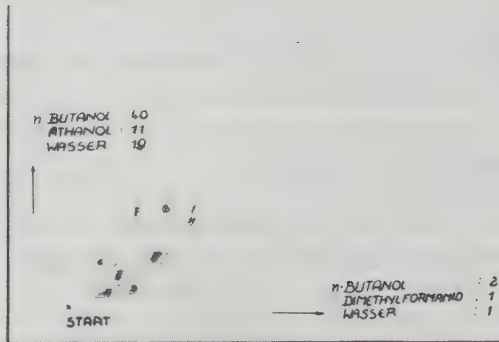


Abb.: 5 Zweidimensionales Chromatogramm I. Trennung einer Glykokoll-HMF-Lösung (pH 3,3), die bei 40° C 20 Std. erhitzt wird.

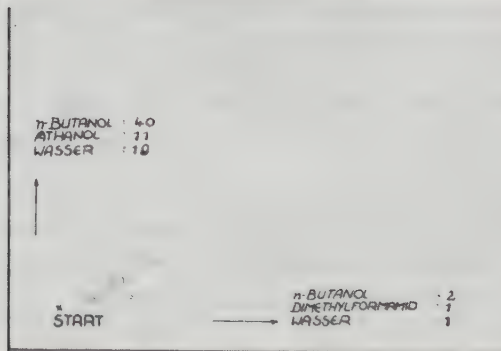


Abb.: 6 Zweidimensionales Chromatogramm II. Trennung einer Glykokoll-HMF-Lösung (pH 6,5), die bei 40° C 20 Std. erhitzt wird.

Aus der Vielzahl der in den Chromatogrammen aufgetrennten Flecken konnte mit Sicherheit nur Glykokoll und HMF nachgewiesen werden.

Auf Grund des Unterschiedes von Chromatogramm I und II darf angenommen werden, daß unter gleichen Reaktionsbedingungen die Acidität der Lösung für den Reaktionsablauf von Bedeutung ist. Ein Vergleich beider mit Ninhydrin und Anilinphthalat sichtbar gemachter Chromatogramme zeigt, daß in der Nähe des Neutralpunktes ($\text{pH} = 6,5$) nur die Hälfte der Reaktionsprodukte entstehen wie in mittelstarker saurerer Lösung ($\text{pH} = 3,3$).

Beim Besprühen des Chromatogramms I ist ein weiterer Umstand zu beachten.

Anilinphthalat reagiert nur mit HMF unter Bildung von gelb bis gelbbrot gefärbten Verbindungen. Alle anderen ersichtlichen Farbflecken entstehen beim Besprühen mit Ninhydrin.

Diese können durch ihren Farbton unterschieden werden:

Fleckenindex	Farbe
A	rötlich-violett
B	rot
C	braun (Farbpigment)
D	braun (Farbpigment)
E	blau (Glykokoll)
F	blau
G	blau
H	gelb
I	rot

Es ist nicht möglich, die Struktur der mit Ninhydrin anfärbbaren definierten Verbindungen zu ermitteln. Es soll jedoch in diesem Zusammenhang nicht unerwähnt bleiben, daß Ninhydrin mit Prolin und seinen Derivaten gelbe, mit Aldehyden und reduzierenden Zuckern rotgefärbte Verbindungen liefert, und daß Amine und vermutlich in Verbindung mit schwachen Säuren, Aminoaldehyde ebenfalls Farbreaktionen mit Ninhydrin geben.

Von den anderen Nachweisreagenzien spricht lediglich die alkalische Silbernitratlösung eindeutig positiv an. Der Nachweis auf Reduktone mit Dinitrophenol-indophenol gelingt nur in Versuchslösungen, die kurze Zeit erhitzt wurden.

Ahnlich verhält sich der Nachweis von fluorescierenden Verbindungen.

Ganz allgemein kann gesagt werden, daß bei allen kurzzeitig ermittelten Aminosäure-Zucker-Lösungen im UV-Licht fluorescierende Verbindungen in unmittelbarer Nähe des Startpunktes beobachtet werden konnten. Bei längerem Erhitzen ging die Adsorptionserscheinung zurück, um nach 15 Stunden gänzlich zu verschwinden.

Rundfilter-Trennung

Als Lösungsmittel diente ein Gemisch von n-Butanol-Wasser-Athanol-Dimethylformamid im Verhältnis 115 : 56 : 22 : 17. Mit diesem Fließmittel konnte nach einer Laufzeit von 8 Std. eine gute Trennung der aufgetragenen Lösung erzielt werden.

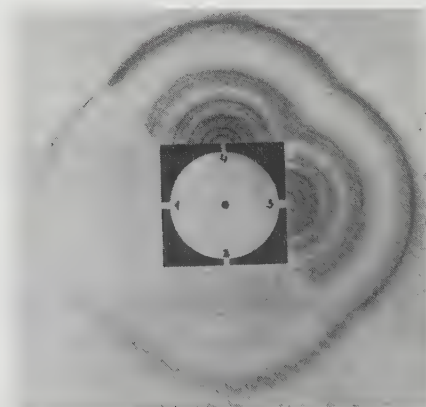


Abb.: 7 Rundfilterchromatogramm einer Glykokoll-HMF-Lösung

- 1 = Testlösung (Glykokoll, HMF)
- 2 = Testlösung (Glykokoll u. HMF 14 Tage bei 20° C und Tageslicht)
- 3 = Versuchslösung (Glykokoll, HMF; pH 3,4 ; t = 20 St., T = 40° C)
- 4 = siehe Punkt 3 (größere Konzentration)

Das entwickelte Karton-Rundfilterchromatogramm ist dem zweidimensionalen aufsteigenden ähnlich. Sein Vorzug liegt bei gleicher Trennwirkung in der kürzeren Laufzeit und des besseren Vergleichs der auf den vier oder sechs Stegen des Chromatogramms aufgetragenen und zu trennenden Untersuchungslösungen.

Bei dieser Art der Rundfilter-Auftrennung ist außerdem eine genaue Identifizierung mittels Vergleichslösungen von Glykokoll und HMF möglich.

Aus der Abbildung geht hervor, daß in dem Segment 1 und 2 keine in den von 3 und 4 braungefärbte Zonen verschiedener Intensität auftreten. Man kann deutlich *n e u n* getrennte braune Pigmentstreifen ausmachen, deren Farbnuancierung voneinander abweicht. Die stärkste Braunfärbung befindet sich in der Nähe der Fließmittelfront (Polymerisationsprodukt von HMF).

Im UV-Licht bei 366 nm können sogar 15 Fluoreszenzstreifen (Probe 3,4) neben zwei (Probe 2) beobachtet werden. Eluiert man letztere mit Wasser und nimmt ihre Absorptionsbanden im UV auf, so weisen beide übereinstimmend bei 262 ein Minimum und bei 276 nm ein Maximum auf.

Auch bei dieser Rundfilter-Auftrennung werden die üblichen Sprüh- und Nachweisreakenzen eingesetzt.

Anilinphtalat zeigt wiederum nur allein HMF an. Der R_F -Wert (Soweit man bei Rundfilterchromatogrammen von einem R_F -Wert sprechen kann) fällt mit dem des Pigmentstreifens, der am stärksten gefärbt ist, zusammen. Die gleiche Aussage erhielten wir bei der Auswertung des Elektropherogramms.

Während Metaperjodat keine Farbreaktion hervorrief, konnte mit Tillmanns Reagens eine Aufhellung der Zonen C, E und I beobachtet werden.

Die Anfärbung mit Ninhydrin zeigte wiederum, daß es neben Aminosäuren (Glykokoll), noch mit einer ganzen Reihe verschiedener unbekannter Verbindungen unter Bildung gefärbter Komplexe zu reagieren vermag.

Auch diese können durch ihren Farbton und ihre verschieden weite Entfernung vom Startpunkt unterschieden werden.

Fleckenindex	Farbe
A	hellviolett
B	violett
C	rötlich
D	blau (Glykokoll)
E	violett (braunstichig)
F	violett
G	blau

Die Zahl der mit Ninhydrin anfärbbaren Zonen ist die gleiche wie im zweidimensionalen Chromatogramm. Der Farbunterschied erklärt sich aus der verschiedenen Konzentration der erfaßten Verbindungen, die im Karton in höherer Konzentration vorliegen.

Zusammenfassung

Der vorliegende Abschnitt berichtet über die Auftrennung der bei der Umsetzung von Glykokoll mit αMF entstandenen dunkelbraunen Reaktionsprodukte und den Versuch ihrer Identifizierung mit bekannten Nachweisreagentien.

Die Auftrennung mit Hilfe der Hochspannungselektrophorese ist nicht geeignet, eine vollständige Trennung der untersuchten Lösung herbeizuführen. Mit einem Boratpuffer von $\text{pH } 5$ wandern sowohl die eingesetzten Reaktionspartner als auch einige Farbpigmente. Ein Testversuch zeigt, daß reines HMF und eine stark braungefärbte Pigmentzone die gleiche Wanderungsgeschwindigkeit in Richtung der Kathode besitzen; zur Kathode wandert auch das reine Glykokoll, während die anderen mit Ninhydrin blaugefärbten Verbindungen zur Anode wandern.

Mit Hilfe der Papierchromatographie gelingt eine zufriedenstellende Auftrennung.

Es wird zweidimensional aufsteigend getrennt. Als erstes Fließmittel dient ein Gemisch von n-Butanol - Äthanol - Wasser im Verhältnis 40 : 11 : 10 und als zweites ein solches von n-Butanol - Dimethylformamid - Wasser, wie 2 : 1 : 1.

Auch die Rundfilter-Trennung kommt zur Anwendung. Das verwendete Fließmittelgemisch besteht aus n-Butanol - Wasser - Athanol - Dimethylformamid im Verhältnis 115 : 56 : 22 : 17.

Von den verwendeten Nachweisreagenzien reagiert Metaperjodat (Polynhydroxyverbindungen) nicht, 2,6 - Dichlorphenolindophenol (Endiole, Reduktone) schwach positiv; Anilinphthalat spricht nur auf HMF an, während das Ninhydrin neben der Aminosäure noch mit einer ganzen Reihe von unbekannten Verbindungen unter Bildung gefärbter Komplexe reagiert.

Im Rundfilterchromatogramm (Testlösung 2) werden im UV-Licht stark fluorescierende Zonen nachgewiesen und diese eluiert. Die aufgenommenen Adsorptionsbanden sind identisch.

Es wird festgestellt, daß die Zahl der fluorescierenden Verbindungen mit wachsender Reaktionszeit abnimmt, Während zu Beginn einer Reaktion (unter Varierung der Reaktionsteilnehmer, der Acidität und der Temperatur) am Startpunkt stark fluorescierende Verbindungen nachgewiesen werden konnten, verschwanden diese im Laufe der weiteren Umsetzung.

Mit Hilfe der angegebenen Methoden gelingt eine Auftrennung der dunkelbraun gefärbten Reaktionslösung in ihre einzelnen Komponenten. Es zeigt sich, daß mit zunehmender Reaktionszeit die Zahl der erkennbaren Pigmentzonen wächst.

Die gebildeten Farbpigmente sind bei den angegebenen Bedingungen wasserlöslich und reagieren sauer auf Lackmus. Bei höherer Temperatur und wachsender Reaktionszeit werden sie zunehmend unlöslich, sowohl in Wasser als auch in verdünnten Säuren.

Eigenschaften der Maillard Reaktionsprodukte

Die oben angegebenen physikalischen Eigenschaften werden in anderen Arbeiten bestätigt. Da die Bedingungen, unter denen die Pigmente entstehen, sehr verschieden sein können, kann eine strenge Übereinstimmung in den einzelnen Aussagen nicht erwartet werden. Im allgemeinen gilt das oben Gesagte.

Die Pigmente, welche sich bei höherer Temperatur und längerer Verweilzeit bilden, sind in Wasser und kalten Säuren unlöslich; heiße Säuren lösen sie nur langsam.

Auch Basen (Ammoniak) vermögen einen Teil des Präzipitats zu lösen. Bei Zugabe von Säure fällt dieses jedoch wieder aus. In stark alkalischem Milieu löst sich das Pigment unter dunkelbrauner Farbe.

Auf die ernährungsphysiologische Bedeutung von zubereiteten Nahrungsmitteln wird in mehreren Arbeiten von B. Bleyer, W. Dieмаir, F. Fischler und K. Täufel (60,61) eingegangen. Die gleichen Autoren untersuchten den Einfluß des Röstens auf verschiedenen Vegetabilien unter Berücksichtigung des Histobasengehaltes, und W. Dieмаir und H. Fox (11) gelang die quantitative Bestimmung von Histidin und Histamin mit Hilfe der Paulyschen Diazoreaktion.

Ender und Theis (55) postulierten für das aus D-Glukose und Glykokoll hergestellte Melanoidin die Summenformel $C_{67}H_{76}N_5O_{32}$. Zu einem ähnlichen Ergebnis kamen Wolfrom, Schlicht, Langer und Rooney (47) mit $C_{6,0}H_{6,4}N_{1,4}O_{2,0}CH_2(COOH)_{0,5}$. Der polymeren Verbindung, die sie durch Erhitzen einer wässrigen Lösung von D-Xylose und Glykokoll bei $95^{\circ}C$ während 90 Stg. unter Stickstoffatmosphäre erhielten, erteilten sie die Formel $C_{5,0}H_{4,7}N_{0,8}O_{1,5}CH_2(COOH)_{0,3}$. Die angegebenen Summenformeln leiteten sie aus Versuchen ab, in denen der Zucker, die Aminosäure oder beide ein C^{14} Atom enthielten.

Ambler (9) bestimmte die Zusammensetzung des löslichen und unlöslichen Anteils eines Melanoidins, welches er bei der Reaktion von D-Glukose (0,11 mol) und Alanin (0,03 mol) in wässriger Lösung erhielt.

Seine unlosliche Fraktion bestand aus: 65 % C, 5,3 % H, 3,2 % N und 31,3 % O; seine lösliche aus: 58,4 % C, 6,4 % H, 3,27 % N und 32,1 % O. Die Differenz dieser beiden Analysen ist gering.

Vergleicht man diese Zahlen mit denen, die Maillard (53) für sein Melanoidin aus der D-Glukose - Glykokoll Reaktion bei 100° C erhielt, so sieht man, daß bei Maillard die Dehydrierung des Zuckers weiter fortgeschritten war. Er analysierte die drei aufeinanderfolgenden Fraktionen A, B und C des Melanoidins und erhielt die in Tabelle 8 aufgeführten Werte.

Tab.: 8 Elementaranalyse von Melanoidinfraktionen

Element %	Fraktion		
	A	B	C
Kohlenstoff	58,6	59,1	58,9
Wasserstoff	4,6	5,0	5,1
Stickstoff	4,4	5,5	6,0
Sauerstoff	32,2	30,4	30,0

In anderen Arbeiten (55) wird auf die Gegenwart von fünf Carboxyl-, acht alkoholischen-, drei phenolischen- und zwei Carbonylgruppen pro Molekül Melanoidin (aus D-Glukose und Glycin) hingewiesen. Wird dieses einer Zinkstaubdestillation unterworfen, so erhalten die Autoren Pyrrole und Pyridine. Oxydation mit Salpetersäure liefert neben Oxalsäure (90) noch andere Säuren.

N-Glycosylaminosäuren sind stärker sauer als die freien Aminosäuren (91). Die beobachtete pH-Abnahme während der Maillard Reaktion ist also z.T. auf das Entstehen solcher Verbindungen zurückzuführen.

R i c h a r d s (92) verfolgte die Umsetzung von D-Glukose und Glycin in Anwesenheit geringer Mengen Wasser, mit Hilfe chromatographischer und spektroskopischer Untersuchungsmethoden.

Von N-D-Glukosylglycin ausgehend fand er nur ein Reaktionsprodukt, abgesehen von einer immobilen braunen Substanz, mit einem R_f -Wert von 0,11. Wachsende Mengen dieser Verbindung wurden bei längerer Reaktionszeit gebildet. Bei saurer Hydrolyse im verschlossenen Reaktionsgefäß konnten Reaktionsprodukte nachgewiesen werden, die im R_f -Wert, in Farbreaktionen und in ihrem UV-Adsorptionsbanden mit Glycin, HMF und nichtumgesetztem Reaktionsteilnehmer identisch waren.

Die isolierte Verbindung ($R_f = 0,11$) gibt mit Phenylhydrazin ein Osazon (IV) und bei Oxydation mit Perjodat drei Mol Ameisensäure pro Mol Verbindung. Diese ist daher offen-kettig und enthält eine Tetrahydroxybutyl-Gruppe. Alle Nachweisreaktionen auf ein Keton verliefen negativ; Fehlingsche Lösung wird hingegen reduziert (93).

Die Umwandlung in ein Osazon weist darauf hin, daß die reduzierende und die Amino-Gruppe am C 1 und C 2 stehen. Das Nichtvorhandensein der Ketogruppe spricht für eine Verbindung vom Typ einer 1-Amino-1-Desoxyketose.

Die Reaktionslösung zeigte bei 290 nm im UV-Absorptionsspektrum ein Maximum (das der Furanverbindung liegt bei 285 nm). Chromatographisch wurde kein HMF nachgewiesen. Dieses bei 290 nm liegende Maximum kann jedoch von der Schiffischen Base (Azomethin) des HMF herrühren, einer Verbindung, deren Entstehung bei der Umsetzung von D-Glukose mit Lysin und D-Glukose mit Phenylalanin schon früher (32,94) postuliert wurde und die auch zu braunen Verbindungen polymerisieren kann.

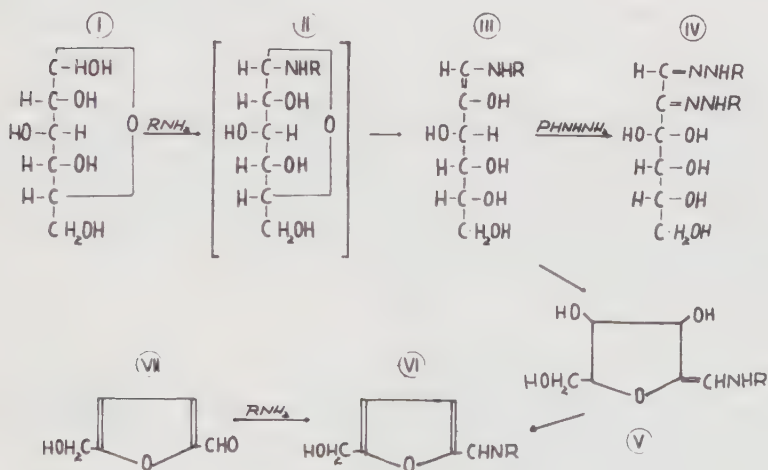
In einer D-Glukose-Lysin-Lösung wurde nach fünf Tagen ein Reaktionsprodukt mit einem $R_f = 0,05$ entdeckt (vermutlich in Übereinstimmung mit einem $R_f = 0,11$ aus D-Glukose und Glycin) und erst nach insgesamt 14 Tagen das postulierte Azomethin des Furfurols nachgewiesen. Dieses Kondensationsprodukt leitete sich augenscheinlich aus der Verbindung, deren R_f -Wert 0,05 betrug, ab.

Das Produkt aus HMF und Lysin hatte den gleichen R_f -Wert wie die Schiffische Base, die man aus D-Glukose und Lysin erhielt. Die

Ergebnisse der IR-Spektroskopie bekräftigen die empirisch gewonnene Aussage, daß die Verbindung mit $R_F = 0,11$ ein Enol des Typus III darstellt.

In verschiedenen Früchten und Gemüsen, die sich während einer Lagerung braun färben, konnten Verbindungen mit sehr ähnlichen Eigenschaften nachgewiesen werden (95,96), ebenso gelang ihre Identifizierung in der Leber (97).

Das folgende Schema faßt die von I - VII postulierten Formeln zusammen:



Aus diesem Schema läßt sich ersehen, daß man sowohl von der Hexose als auch ihrem Dehydrierungsprodukt, dem HMF, mit einer Aminoverbindung zur Schiff'schen Base VI gelangen kann. Die Verbindung II stellt die Enol-Form der Amadori-Umlagerungsverbindung dar.

Die Bildung von 5-Hydroxymethylfurfurol und seine Bedeutung für die Maillard-Reaktion

Eingangs dieser Arbeit (Abschnitt I) wurde auf die große Bedeutung des HMF für die Maillard Reaktion hingewiesen und in mehreren Versuchen diese Behauptung experimentell belegt. So nimmt z.B. die optische Dichte einer wässrigen Glykokoll-HMF-Lösung sieben bzw. zehn mal so schnell ab wie die der entsprechenden D-Fruktose- und D-Glukose-Lösung.

In den Arbeiten anderer Autoren ist immer wieder auf das Vorhandensein von HMF bei der Bräunungsreaktion (32,94,92) hingewiesen worden und selbst im vorausgegangenen Kapitel (siehe Formelschema) diente das HMF als ein möglicher Reaktionspartner für die Bildung einer Schiffischen Base. Es erscheint daher berechtigt, auf die HMF-Bildung im folgenden näher einzugehen.

5-Hydroxymethylfurfurol ist ein Anhydrid der verschiedenen Monosaccharide und entsteht neben diesen auch aus Disacchariden und Polysacchariden in wechselnden Mengen bei der thermischen Zersetzung in saurem Milieu. Die ersten Mitteilungen über das Auftreten von HMF bei der Wärmebehandlung von wässrigen Fruktoselösungen in Anwesenheit von Oxalsäure finden wir bei D r ü l l und L i n t e r (90).

S m i r n o v (99) beschrieb den direkten Einfluß des Säuregrades bei der HMF-Bildung aus D-Glukose- und D-Fruktoselösungen. Er wies darauf hin, daß in Abhängigkeit zur Acidität die Kurve des gebildeten HMF ein Minimum durchläuft. Dieses liegt bei der D-Glukose in einem pH-Bereich $\text{pH} = 3,0 - 3,5$ und bei D-Fruktose in einem solchen von $\text{pH} = 3,5 - 4,0$. Bemerkenswert ist auch der steile Anstieg der beiden Kurven im stark sauren Gebiet, während bei kleinen Säurekonzentrationen nur ein sehr schwacher Anstieg zu beobachten ist. Wie schon aus früheren Untersuchungen hervorgeht, ist die gebildete Menge von HMF aus Fruktose größer als diejenige aus Glukose.

Eine experimentelle Nachprüfung hat seine Aussagen bestätigt. Das entstandene und wohldefinierte HMF ($\text{C}_5\text{H}_6\text{O}_3$) ist jedoch nicht

stabil. In einer tiefergehenden Umwandlung spaltet das Molekül Ameisensäure ab und geht dabei in Lävulinsäure über. Letztere Reaktion ist noch nicht aufgeklärt.

Theoretische Deutung der HMF-Bildung aus Glukose

bekanntlich tritt eine Absorption im Spektralbereich von 200 - 400 nm an chromophoren Gruppen ein, die bei organischen Molekülen im wesentlichen ungesättigter Natur sind. Wenn auch das Lösungsmittel eine Rolle spielt, so kann man doch die allgemeine Aussage machen, daß Ringsysteme mit zwei konjugierten Doppelbindungen eine Adsorption im Bereich von 260 - 280 nm erleiden; α , β ungesättigte Ketone weisen eine charakteristische Bande zwischen 230 - 260 nm auf (100).

Wolfram, Schuetz und Cavalieri (101) bedienten sich der UV-Spektroskopie, um Einsicht in den Mechanismus und die Zwischenprodukte der Umwandlung von D-Glukose zu HMF zu erhalten. Der Katalysator dieser Reaktion war Salzsäure. Die beobachteten Absorptionsbanden sind aus Abbildung 7* zu ersehen.

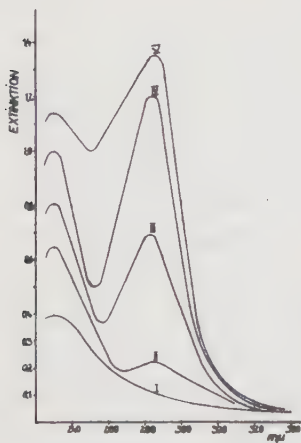


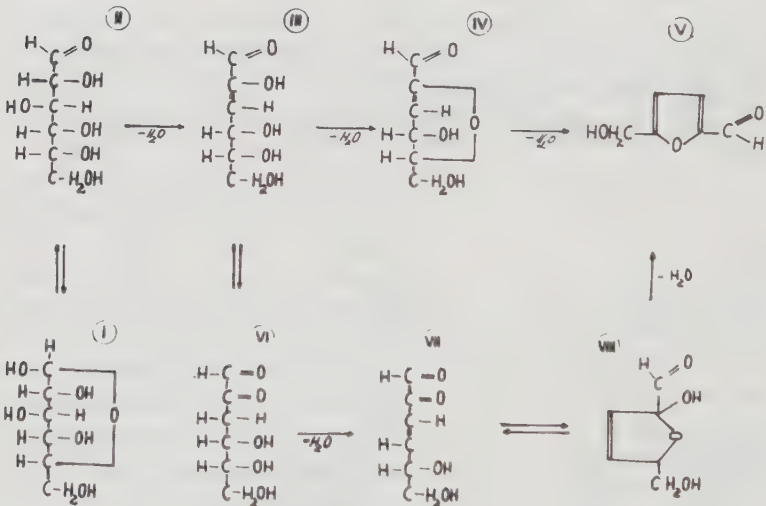
Abb.: 7*

Wässrige Glukose-Lösungen wurden erhitzt. Nach 3 1/2 Stunden wurde eine Bande bei 228 nm beobachtet (Kurve I). Nach weiteren 8 Stunden verstärkte sich das Maximum bei 228 nm und gleichzeitig wurde ein neuer Peak im Gebiet von 285 nm entdeckt. Nach 12 Stunden entsprach die vollständige Absorptionsbande der Kurve III. Man konnte beobachten, daß bei zunehmender Reaktionszeit die Bande bei 285 nm immer stärker adsorbierte (Kurve IV) und nach ungefähr 23 Std. war das typische HMF-Spektrum erreicht (Kurve V). Weitere Versuche unter gleichen Bedingungen, nur mit

verschiedenem Säuregrad (pH 4,3 und 2,0), folgten. Allen war gemeinsam, daß sie bei unterschiedlicher Zeitdauer und steigender Acidität einander ä h n l i c h e UV-Absorptionsspektren aufwiesen. Dies beweist, daß der Reaktionsablauf unabhängig von dem Säuregrad zwischen pH=2,0 bis 6,3 der gleiche ist. Die HMF-Bildungsgeschwindigkeit nimmt mit erhöhter Temperatur und Acidität zu.

Von obigen Autoren wird folgender Reaktionsmechanismus postuliert:

Die Lactolform der D-Glukose (I) geht zunächst in die offenkettige Aldehydform (II) über. Aus dieser entsteht unter Wasserabspaltung ein konjugiertes Enol (III).



Zu dessen Beweis ziehen sie die Absorptionskurve V und ihren Verlauf heran (Abb. 8).

Evans und Gillam (102) haben gezeigt, daß β -ungesättigte Aldenylde ($R - CH = CR - CHO$), eine starke Absorption bei einer Wellenlänge von 230 nm, zeigen. Außerdem gelang Wolfrom und Mitarbeitern (103) bei der Umwandlung von 2,3, 4,6-Termametyl-D-1,2-Glukosen zu 5-Methoxymethylfurfurol die Isolierung eines der Verbindung III ähnlichen Zwischenproduktes.

Die postulierte Verbindung III kann durch cyclische Dehydration IV bilden und aus dieser kann durch eine nochmalige Wasserabspaltung und Entstehen einer dritten Doppelbindung das HMF gebildet werden.

Das Auftreten der Zwischenverbindungen VI, VII und VIII wird durch die Arbeit von Wolfrom, Wallace und Metcalf ebenfalls experimentell bewiesen wie die Dehydrierung einer Hydroxylgruppe, die in β Stellung zu einer Carboxylgruppe steht (Zwischenverbindung VI). Unter Wasserabspaltung geht VI in VII über, das mit seiner Ringform (VIII) im Gleichgewicht steht. Von dieser gelangt man unter einer nochmaligen Wasserabspaltung zum HMF.

Quantitative Bestimmung des 5-Hydroxymethylfurfurols

Die quantitative Bestimmung des HMF erlangte erst in der Lebensmittelanalytik seine volle Bedeutung und konnte in der Folge durch die Arbeiten von Fiehe (104), Kruisheer (105), Suiser und Högl (106) ausgeführt werden. Diese Verfahren haben jedoch keine allgemeine Anwendung gefunden, da sie zu zeitraubend waren oder keine exakten Werte lieferten. Da man HMF nicht quantitativ aus einer wässrigen Lösung ausschütteln kann, war es notwendig geworden, die HMF-Bestimmung direkt in der Lösung durchzuführen.

Eine Möglichkeit dazu bietet die von Winkler (107) entwickelte kolorimetrische Methode. Die nach diesem verfahren erhaltene Rotfärbung einer mit p-Toluidin- und Barbitursäure umgesetzten HMF-haltigen Lösung erreicht nach 3 - 4 Minuten ihr Farbmaximum. Mißt man innerhalb dieses Zeitraumes die Extinktion bei 550 nm in einem Colorimeter, so kann man unter Verwendung einer Eichkurve diese Methode zur quantitativen Bestimmung des HMF heranziehen.

Aus den Extinktionswerten der Tabelle 9 geht hervor, daß sowohl geringe Mengen an HMF mittels dieser Farbreaktion nachgewiesen werden können als auch das Lambert-Beersche Gesetz über einen großen Konzentrationsbereich Gültigkeit hat.

Tab.: 9 Extinktionswerte der kolorimetrischen Eich-tabelle

Testlösung mg HMF/1000 ml	Extinktion	
	Küvette 0,5 cm	Küvette 1,0 cm
5,0	0,059	0,118
7,5	0,096	0,192
17,5	0,224	0,449
25,0	0,321	0,640
45,0	0,572	-
55,0	0,719	-
65,0	0,965	-

Ausführung der Bestimmung:

Je 2 ml der zu untersuchenden Lösung werden mit je 5 ml einer p-Toluidinlösung versetzt. Zu der Vergleichsprobe gibt man 1 ml destilliertes Wasser zu der Meßlösung 1 ml Barbitursäurelösung hinzu. Darauf schüttelt man gut um und füllt in die Küvetten. Man mißt nun laufend die Extinktion im Photometer (Zeiss ELCO 2) bei 550 nm (Filter S 55 E 50). Bei geringer HMF-Konzentration stellt sich das Extinktionsmaximum bereits nach 1 - 2 Minuten, bei größerer Konzentration erst nach 3 - 4 Minuten. Die dazu gehörigen HMF-Werte können aus der Eich-tabelle 9 entnommen werden.

Reagentien:

p-Toluidinlösung; 10 g p-Toluidin werden in 50 ml Isopropanol gelöst, mit 10 ml Eisessig versetzt und im 100 ml Meßkolben mit Isopropanol aufgefüllt. Die Lösung ist im Tiefkühlschrank aufzubewahren oder jeden Tag neu anzusetzen.

Barbitursäurelösung; Es werden 500 mg Barbitursäure in 100 ml destilliertem Wasser gelöst.

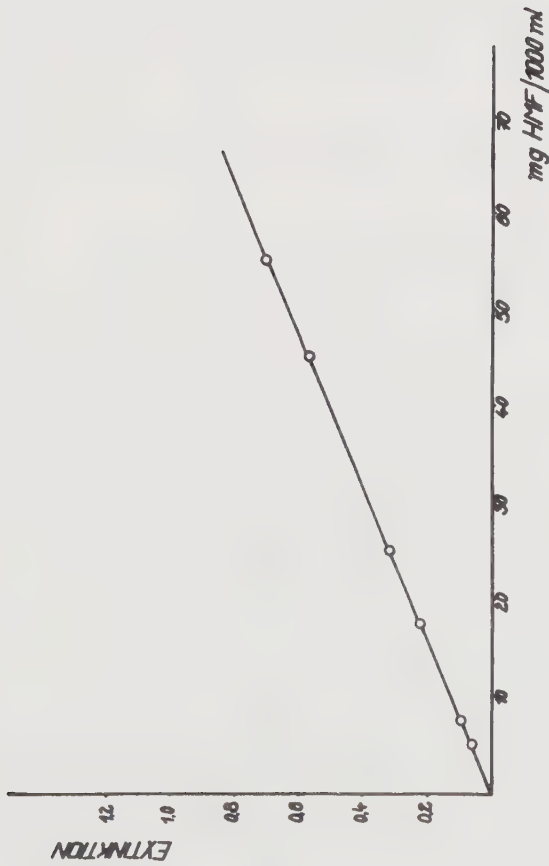


Abb.: 9 Eichkurve für die HMF Bestimmung

Eine andere Möglichkeit der quantitativen HMF-Bestimmung beruht auf der Anwendung der spektrophotometrischen Methode. Diese liefert sehr genaue Werte und ihr Zeitaufwand ist gering. Da diese Methode jedoch möglichst reine und farblose Reaktionslösungen verlangt, die hier nicht vorliegen, so muß auf ihre Anwendung verzichtet werden. Auch eine papierchromatographische Auftrennung mit nachfolgender Eluierung wird wegen des großen Zeitaufwandes nicht angewendet.

Unter diesen Umständen erscheint die Methode nach Winkler zur Bestimmung von HMF in unserem Fall am geeignetsten.

Bildung von 5-Hydroxymethylfurfurol in Gegenwart verschiedener Puffersysteme

Zu Beginn dieses Abschnittes wurde ein kurzer Überblick über die experimentelle und theoretische Kenntnis des Auftretens von HMF gegeben.

Wiederholt man diese Versuche, die alle unter definierten Reaktionsvariablen ablaufen (Konzentration, Temperatur, Zeit und Acidität), so stellt man fest, daß in saurem Milieu in Abwesenheit eines Puffers die Acidität der Lösung zunimmt. Die gebildete und mit der kolorimetrischen Methode nachgewiesene Menge an HMF ist unter Definierung der angeführten Variablen innerhalb der Fehlergrenze immer gleich.

Diese Aussage gilt nicht mehr, wenn man die gleichen Testversuche in Pufferlösungen (bei gleichem Säuregrad) ausführt. Der Säuregrad bleibt während des Versuchs konstant. Aber die Anwesenheit verschiedener Pufferanionen ist bei der Bildung von HMF aus wässrigen Hexoselösungen von Bedeutung.

Tab.: 10 Abhängigkeit der HMF-Bildung vom Puffersystem

t Std.	% Extinktion						T °C
	D-Glukose			D-Fruktose			
	Puffer			Puffer			
	I	II	III	I	II	III	
15	0,032	0,035	0,060	0,364	0,630	0,745	75,2
24	0,052	0,057	0,087	1,775	3,000	3,510	70,2
39	0,070	0,077	0,133	3,300	5,610	6,600	70,1
48	0,073	0,083	0,155	3,616	6,560	9,60	70,2
63	0,106	0,122	0,260	4,940	10,260	12,60	70,3
72	0,152	0,170	0,310	7,242	12,240	14,28	71,0
142	0,330	0,415	0,800	-	-	-	70,6

15 g einer Hexose werden in 50 ml Pufferlösung I, II und III gelöst (pH = 3,45; T = 70° C). Zur angegebenen Zeit wird in Proben nach der kolorimetrischen Methode die Extinktion gemessen (Filter: S45 E56; 0,5 cm Küvetten).

Pufferlösung: pH 3,45

- I Salzsäure-Natriumcitrat, 46,1 ml einer 0,1 m Natriumcitratlösung (21,008 g Citronensäure-Monohydrat + 200 ml n-NaOH im Liter) werden mit 53,9 ml 0,1 n Salzsäure versetzt.
- II Salzsäure-Kaliumbiphtalat, 91,23 ml einer 0,2 m Kaliumbiphtalatlösung (40,836 g im Liter) werden mit 8,77 ml einer 0,1 n Salzsäure versetzt.
- III Citronensäure-Phosphnat, 29,5 ml einer 0,1 m Citronensäure werden mit 70,5 0,2 m Lösung vermischt.

Ergebnis:

Die vorliegenden Werte der Tabelle 10 lassen erkennen, daß in den D-Fruktoselösungen mehr HMF gebildet wird als in den vergleichbaren D-Glukoselösungen. Das HMF-Verhältnis beträgt etwa 1 : 10.

Die Acidität der einzelnen Lösungen bleibt innerhalb der Reaktionszeit (142 Std.) konstant. Verfolgt man die Zunahme der einzelnen Tabellenwerte, so stellt man fest, daß diese nicht gleichmäßig verläuft. Überträgt man sie zur besseren Übersicht in ein Schaubild, so sieht man, daß die einzelnen Kurvenäste nach anfänglicher Steigung flacher werden. Dieser Kurvenverlauf trifft für die Pufferlösungen I, II und III des Glukosesystems und für I und II des fruktosesystems zu.

Am auffälligsten ist jedoch die Tatsache, daß die gebildete Menge an HMF direkt von der Wahl des Puffersystems abhängt. In Übereinstimmung mit den beiden Hexoselösungen kann gesagt werden, daß unter gleichen Reaktionsbedingungen (Konzentration, Temperatur, Acidität und Zeit) die Konzentration an HMF in der Reihenfolge der Pufferlösungen: Salzsäure-Natriumcitrat, Salzsäure-Kaliumbiphtalat und Citronensäure-Phosphat zunimmt.

Einfluß individueller Aminosäuren auf die Bildung von 5-Hydroxymethylfurfurol in Hexoselösungen

Im vorhergehenden Abschnitt wurde die Bildung von HMF unter dem Einfluß verschiedener Puffersysteme betrachtet. Es ist naheliegend, auch den Einfluß von Aminosäuren auf das Entstehen von HMF aus sauren Hexoselösungen zu untersuchen. Diese Versuche gewinnen vor allem dann an Bedeutung, wenn man bedenkt, daß HMF allein die Braunung und in Verbindung mit Aminosäuren die Maillard-Reaktion beschleunigt.

Man erhitzt wässrige Lösungen (je 0,1 mol. an D-Glukose oder D-Fruktose und einer Aminosäure) bei 70° C im Trockenschrank. Die Anfangsacidität beträgt im Mittel pH = 4,7 und nimmt gegen Ende des Versuchs ab. Die Veränderung des Säuregrades ist aus der Tabelle 3 (s. Seite 23) zu entnehmen. Nach verschiedenen Zeiten wird eine Probe entnommen und nach der kolorimetrischen Methode ihr HMF-Gehalt ermittelt.

Tab.: 11 Gebildete Mengen von 5-Hydroxymethylfurfurol in einer D-Glukoselösung in Gegenwart verschiedener Aminosäuren

Aminosäure (0,1 mol/l)	5-Hydroxymethylfurfurol (mg in 1000 ml)				
	Zeit (Std.)				
	68	112	139	164	190
DL-Alanin	0,50	1,00	1,80	3,00	4,60
DL-Valin	0,85	3,00	5,50	8,00	12,70
DL-Serin	0,85	3,30	6,00	8,60	14,00
L-Lysin	1,00	3,00	5,10	7,50	11,00
L-Lysin (pH 6,2)	0,85	3,30	6,00	-	14,50
D-Glukose (rein)	-	-	-	0,30	0,70

Tab.: 12 Gebildete Mengen von 5-Hydroxymethylfurfurol in einer D-Fruktoselösung in Gegenwart verschiedener Aminosäuren

Aminosäure (0,1 mol/l)	5-Hydroxymethylfurfurol (mg in 1000 ml)			
	Zeit (Std.)			
	68	112	139	164
DL-Alanin	3,5	12,0	19,8	29,0
DL-Valin	3,5	10,2	15,5	21,2
DL-Serin	4,0	11,7	17,4	24,0
L-Lysin	6,6	17,8	25,0	34,0
L-Lysin (pH 6,2)	2,8	10,8	-	27,8
D-Fruktose (rein)	0,7	2,0	3,1	4,5

Ergebnisse:

Faßt man die Werte beider Tabellen zusammen, so ergibt eine Überprüfung folgendes Bild:

In Gegenwart von Aminosäuren wird die Bildung von HMF aus Hexosen b e s c h l e u n i g t . In Übereinstimmung mit anderen Versuchsergebnissen ist auch hierbei die gebildete Menge an HMF in D-Fruktoselosungen beträchtlich größer als die in vergleichbaren D-Glukoselosungen.

Die "katalytische" Wirkung der untersuchten Aminosäuren ist in beiden Testlösungen verschieden.

In D-Glukoselosungen nimmt sie in der Reihenfolge - Alanin - Lysin - Valin - Serin, in D-Fruktoselosungen jedoch in derjenigen von - Valin - Serin - Alanin - Lysin zu.

Eine exakte Erklärung dieser Tatsache kann aus dem experimentellen Befund nicht gegeben werden. Man wird jedoch mit der Annahme nicht fehlgehen, daß die ersten Umsetzungsprodukte beider Komponenten leichter unter Wasserabspaltung in eine Schiffscische Base von HMF übergeführt werden können und diese wiederum unter Hydrolyse zu HMF und der Aminokomponente zerfällt.

Diese Erklärung findet sich auch in dem Schema der Melanoidinbildung nach H o d g e (108) und soll an späterer Stelle noch ausführlicher diskutiert werden.

Einfluß der Acidität und der Aminosäurekonzentration auf die 5-Hydroxymethylfurfurolbildung

In der Arbeit von A. S m i r n o v (99) wurde erstmals auf den Einfluß des Säuregrads bei der Bildung von HMF aus reinen Hexoselosungen hingewiesen.

Es ist zu erwarten, daß auch in Aminosäure-Zucker-Lösungen der pH der Lösung von Einfluß auf die HMF-Bildung ist.

Man erhitzt wässrige Aminosäure - Glukose - Lösungen (0,14 mol an L-Glutaminsäure und 1,0 mol an D-Glukose) bei 70° C im Trockenschrank. Der gewünschte Säuregrad wird unter Verwendung von Salzsäure und Natronlauge eingestellt. Nach verschiedenen Zeiten wird eine Probe entnommen und nach der kolorimetischen Methode in HMF-Gehalt ermittelt.

Tab.: 13 Abhängigkeit der HMF-Bildung in einer Glutaminsäure D-Glukose-Lösung vom Säuregrad der Lösung

Säuregrad pH anfang Ende		5-Hydroxymethylfurfural (mg in 1000 ml)					Farbe der Lösung
		Zeit (Std.)					
		3	9	26	33	52	
1,65	1,95	1,1	5,7	9,0	13,5	32,2	farblos
2,65	2,75	0,6	1,3	2,1	2,7	4,1	farblos
3,55	3,25	-	-	1,6	2,1	3,0	gelblich
4,60	4,60	-	1,0	1,1	2,1	3,4	schw.gelb
5,60	5,00	-	1,1	1,7	2,9	3,6	gelb

Ergebnis:

Aus der Tabelle 13 läßt sich erkennen, daß die Farbe der Lösung mit abnehmendem Säuregrad zunimmt. Testlösungen mit einem pH von 1,65 und 2,65 sind nach 52 Stunden noch farblos, verfärben sich aber mit abnehmendem Säuregrad über gelblich nach gelb.

Auch die Acidität der Lösung ändert sich. In stark saurem Milieu nimmt der Säuregrad ab, steigt aber im mittel- und schwachsaurem Milieu gegen Versuchsende an.

Das gleiche Verhalten des Säuregrades finden wir in reinen Hexose-Modell-Lösungen.

Aus den Tabellenwerten läßt sich außerdem der Einfluß der Säurekonzentration auf die HMF-Bildung ersehen. In Analogie zu den Versuchsergebnissen nach S m i r n o v finden wir, daß auch in einer L-Glutaminsäure - D-Glukoselösung die gebildete Menge an HMF bei einem pH 3,55 am g e r i n g s t e n ist und sowohl in stärker als auch in schwächer saurem Milieu höhere HMF-Konzentrationen vorliegen. Überträgt man die Werte der besseren Übersicht in ein HMF/pH-Diagramm und betrachtet bei einer bestimmten Zeit den Verlauf der sich ergebenden Kurve, so ergibt sich folgendes Bild:

Das Minimum der Kurve liegt bei pH 3,55; sie steigt im Gebiet höherer Protonenkonzentration steil und in schwachsaurerer Lösung nur sehr flach an.

In den vorausgegangenen Abschnitten wurde der Einfluß des Säuregrades, und in einer vergleichenden Prüfung verschiedener Aminosäuren ihre Fähigkeit in Hexoselösungen, HMF zu bilden, untersucht.

Im nachfolgenden Versuch soll die HMF-Bildung in Abhängigkeit von der Aminosäurekonzentration betrachtet werden.

Wässrige Lösungen von D-Glukose (1,6 mol) und L-Glutaminsäure verschiedener Konzentration werden bei 70° C im Trockenschrank ernetzt. Die Anfangsacidität beträgt im Mittel pH = 3,5 und nimmt gegen Ende des Versuchs ab (verwendete Säure HCL). Zu verschiedenen Zeiten wird eine Probe entnommen und ihr HMF-Gehalt nach der kolorimetrischen Methode ermittelt.

Tab.: 13 Abhängigkeit der HMF-Bildung in einer D-Glukose-Lösung von der L-Glutaminsäurekonzentration

L-Glutamin- säure (mol/l)	5-Hydroxymethylfurfurol (mg in 1000 ml)				Farbe der Lösung
	Zeit (Std.)				
	1 1/2	6	21	30	
0,70	2,0	4,6	95,0	380,0	gelb
0,40	1,4	2,3	83,0	348,0	gelb
0,14	0,7	1,1	13,4	26,7	gelblich
0,07	-	0,4	3,7	6,5	farblos
0,014	-	0,3	0,5	1,9	farblos
0,007	-	-	0,4	1,5	farblos

Ergebnis:

Vorliegende Versuchsergebnisse lassen erkennen, daß sich mit zunehmender Aminosäurekonzentration die Testlösung gelb färbt. Wie bereits in der Legende erwähnt, und in Übereinstimmung mit anderen Aussagen, nimmt der Säuregrad der Lösung gegen Versuchsende zu. Der Säuregrad in den beiden Lösungen mit der höchsten Aminosäurekonzentration beträgt pH = 3,35 und in allen weiteren pH 3,45.

Es ist weiterhin deutlich zu sehen, daß mit zunehmender Aminosäurekonzentration der HMF-Gehalt der D-Glukoselösung ansteigt. Aus dieser Tatsache darf geschlossen werden, daß eine Umsetzung der beiden Reaktionsteilnehmer zur beschleunigten Bildung von HMF oder HMF-ähnlichen Produkten führt.

Zusammenfassung:

Die Untersuchungen erstrecken sich im vorangegangenen Kapitel auf die Bildung von 5-Hydroxymethylfurfurol in Hexoselösungen und dessen Nachweis mit Hilfe einer kolorimetrischen Methode.

In reinen Hexoselösungen (D-Glukose und D-Fruktose) ist die Bildung von HMF vom Säuregrad der Lösung abhängig.

In einem HMF/pH-Diagramm durchläuft die Kurve ein Minimum (D-Glukose und D-Fruktose pH = 3,5) und steigt in stark saurer Lösung steil, in schwach saurer flach an.

Gepufferte Hexoselösungen erleiden für die Dauer des Versuchs keine Änderung ihrer Acidität. Bei gleichem Säuregrad ist die gebildete Menge an HMF vom verwendeten Puffersystem abhängig.

Aus den Versuchsergebnissen geht hervor, daß in der Reihenfolge der Anionen Citrat, Bicarbonat und Phosphat die Bildung von HMF in der Reaktionslösung begünstigt wird.

Auch hier übertreffen die in den Fruktoselösungen gefundenen HMF-Werte die der Glukoselösungen.

Die Anwesenheit individueller Aminosäuren in Hexoselösungen beschleunigt die Bildung von HMF. Die Reihenfolge der beschleunigenden Wirkung der untersuchten Aminosäuren Alanin, Valin, Serin und Lysin ist in den beiden Testlösungen von D-Glukose und D-Fruktose verschieden.

Es wird an einer L-Glutaminsäure-D-Glukoselösung gezeigt, daß die Menge des gebildeten HMF vom Säuregrad der Lösung abhängt.

Von stark saurer Lösung ausgehend, fallen die HMF-Werte schnell ab, durchlaufen bei pH = 3,5 ein Minimum und nehmen mit zunehmendem pH nur unwesentlich zu.

Verändert man bei gleichbleibender Hexosekonzentration die Menge an zugesetzter Aminosäure (L-Glutaminsäure), so erkennt man, daß auch mit steigenden Konzentrationen derselben die HMF-Werte in der Lösung ansteigen.

Die kolorimetrische Methode nach Winkler wird zur quantitativen HMF-Bestimmung herangezogen.

Es wird eine Eichtablette aufgestellt, die die Extinktionswerte der mit p-Toluidin und Barbitursäure versetzten HMF-haltigen Lösungen enthält.

Mechanismen und kinetische Studien der Reaktion

Es ist zweckdienlich, diese beiden Begriffe im Zusammenhang mit der komplexen Vorstellung, die wir von der Maillard-Reaktion besitzen, gemeinsam zu betrachten, zumal die meisten der kinetischen Studien auf gewissen Annahmen beruhen, die den Mechanismus der Reaktion betreffen.

Nach der Einschränkung, die wir zu Beginn der Arbeit vornahmen, wird auch im folgenden Abschnitt nur auf die in s a u r e m Milieu stattfindende Reaktion eingegangen werden.

Methode zur kinetischen Betrachtung der Reaktion einer Aldose, Ketose oder des 5-Hydroxymethylfurfurols mit einer Aminosäure.

Eine Hexose- bzw. HMF-Lösung ist an einer Aminosäure g e - s ä t t i g t . Wird durch eine Reaktion ein Teil der gelösten Aminoverbindung verbraucht, so geht ein äquivalenter Betrag von kristallisierter Aminosäure in Lösung.

Das Ausmaß, mit dem die Aminosäure mit dem zweiten Reaktionspartner reagiert, wird durch den Betrag, den die feste Phase in Lösung bringt, ausgedrückt.

Mißt man konsequenterweise die Zuwachsrates an löslichem Stickstoff in einem solchen System, so hat man eine gute Möglichkeit, die Geschwindigkeit solcher Reaktionen zu studieren.

Man vereinfacht den kinetischen Ablauf, wenn das an einer Aminosäure gesättigte System eine hohe Konzentration an dem zweiten Reaktionsteilnehmer enthält. In diesem Fall darf dessen Konzentration als konstant während des ganzen Reaktionsverlaufs angesehen werden.

Im folgenden werden allgemeine Gesetzmäßigkeiten unter dieser einschränkenden Annahme aufgestellt und es wird gezeigt, daß die gewünschten experimentellen Bedingungen eine Anwendung dieser Gleichungen, auf unseren Fall übertragen, erlauben.

Allgemeine Einführung in den Reaktionsablauf (69)

Man nimmt an, daß sich die Aminosäure im äquimolekularen Verhältnis mit der Zuckerkomponente bzw. ihrem Umwandlungsprodukt dem HMF umsetzt. Dabei reagiert die NH_2 -Gruppe der Aminosäure mit der CHO-Gruppe des Zuckers bzw. des Furanderivates unter Wasseraustritt und es entsteht ein Reaktionsprodukt, das im folgenden als Schiffische Base bezeichnet wird.



Wir bezeichnen mit C_N die Konzentration der N-stickstoffhaltigen Verbindungen (millimol/Liter). Dieser Wert setzt sich aus dem Anteil der Aminosäure, der Schiffischen Base und den stickstoffhaltigen Zersetzungsprodukten der letzteren Verbindung zusammen. Reaktionen, an welchen diese Zersetzungsprodukte teilnehmen, werden in dieser Arbeit nicht berücksichtigt, da sie die erste Phase der Reaktion zwischen Aminosäuren und Zuckern oder ihren Umwandlungsprodukten nicht beeinflussen.

$$\frac{d \text{C}_\text{N}}{dt} = \text{K}_1 \cdot \text{C}_\text{K} \cdot \text{C}_\text{A} - \text{K}_2 \cdot \text{C}_\text{AK} \quad (1)$$

C_K = Konzentration des Kohlenhydrats oder 5-hydroxymethylfurfurols

C_A = Konzentration des Aminosäurekations *

C_AK = Konzentration des Reaktionsprodukts (Schiffische Base)

*) Schon bei der Betrachtung der einfachsten Aminosäure, des Glykokolls, tritt der eigentümliche Doppelcharakter dieser Verbindung in Erscheinung ($\text{H}_2\text{N} \text{CH}_2 - \text{COOH}$). Das Molekül enthält einmal die saure Carboxylgruppe und daneben die basische Aminogruppe. Eine solche Verbindung kann entweder als Säure oder als Base reagieren. Man bezeichnet solche Substanzen als amphotere Stoffe, oder als Ampholyte.

K_1 ist die Reaktionsgeschwindigkeitskonstante für die Bildung der Schiffischen Base, K_2 deren Zerfallskonstante. Hierbei nimmt man an, daß die Hydrolyse dieser Verbindung zumindestens im Hinblick auf die Aminosäure reversibel verläuft.

C_K wird ebenso wie C_A während der Reaktion als konstant angesehen. Letztere Annahme beruht auf der Eigenschaft der verwendeten Aminosäuren innerhalb kurzer Zeit ihre Sättigungskonzentration zu erreichen.

Der zweite Ausdruck der Gleichung 1 ist dann Null, wenn die Schiffische Base eine stabile Verbindung darstellt, oder wenn das Zerfallsprodukt im Hinblick auf die Aminosäure vollkommen irreversibel ist.

Die integrierte Form der Gleichung 1 lautet:

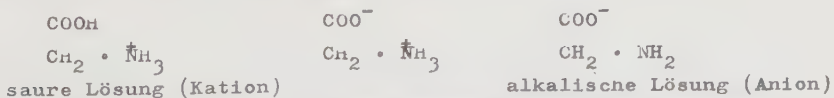
$$C_A - C_{No} = K_1 C_K C_A t - K_2 \int_0^t C_{AK} dt \quad (2)$$

Nimmt man an, daß nach einer Zeit t_x ebensoviel an Schiffischer Base gebildet wird wie auch wieder zerfällt, so kann der letzte

Man hat über dieses Verhalten der Aminosäuren verschiedene Anschauungen entwickelt und schon früher angenommen, daß zwischen der Amino- und Carboxylgruppe eine innere Salzbindung stattgefunden hat. Die Aminosäuren besitzen demnach den Charakter von intramolekularen Salzen. Tatsächlich liegen die Aminosäuren in wässriger Lösung als sogenannte Zwitterionen vor (z.B. $H_3N^+ \cdot CH_2 \cdot COO^-$).

In der nicht ionisierten Form, welche die gebräuchliche Schreibweise darstellt, existiert in wässriger Lösung nur ein verschwindend kleiner Bruchteil der Aminosäure. Sogar im Kristall liegen die α -Aminosäuren als Zwitterion vor. Das letztere stellt also die stabile Form der Verbindung dar.

In saurer Lösung liegen die Aminosäuren als Kationen, in alkalischer als Anionen vor. Bei einem bestimmten mittleren pH-Wert oder innerhalb einer bestimmten pH-Zone existieren sie in der neutralen Form, d.h. als Zwitterion:



Diejenigen Aminosäuren, bei denen mehrere saure oder basische Gruppen im Molekül vorkommen, zeigen natürlich den Charakter der im Überschuß vorhandenen Gruppen. So besitzen z.B. die Glutaminsäure und die Asparaginsäure ausgesprochen saure Natur, da auf eine Aminosäure zwei Carboxylgruppen entfallen. Das Lysin dagegen, welches neben zwei Aminogruppen nur eine Carboxylgruppe enthält,

Ausdruck der Gleichung (2) umgeformt und in zwei Teile zerlegt werden. Der erste Teil bezieht sich dann auf das Reaktionsprodukt C_{AK} , dessen Konzentration variabel ist und einen zweiten Teil, dessen Konzentration an C_{AKx} konstant ist.

$$(3) C_{Nt} - C_{No} = K_1 C_K C_A t - K_2 \int_0^{t_x} C_{AK} dt - K_2 C_{AKx} (t - t_x)$$

Bezüglich des letzten Ausdrucks ist es sinnvoll, ihn nur dann zu betrachten, wenn die Werte für t größer sind als t_x .

Die dazugehörige Kurve besteht aus drei Teilen. Einem linearen Teil, der sich auf den ersten Ausdruck bezieht, einem gekrümmten Teil (für t -Werte die nahe an t_x liegen) und zum Schluß wieder aus einem linearen Teil, dessen t -Werte größer als t_x sind.

Gelänge es durch irgendeinen Mechanismus, den Zerfall der Schiff-schen Base so lange aufzuhalten, bis ihre Konzentration derjenigen des stationären Zustandes entspräche und, wenn man jetzt diese "Zerfallsbremse" entfernen würde, so könnte man unmittelbar den stationären Zustand einstellen.

Man kann nun feststellen, daß der hypothetisch angenommene Mechanismus der Reaktion zwischen einer Aminosäure und der Zuckerkomponente zwei gerade Linien ergibt, die *i d e n t i s c h* mit denen sind, die man aus dem Experiment erhält. Der Schnittpunkt beider Geraden ergibt den Betrag der Schiff-schen Base im stationären Zustand.

Bestimmung der Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten:

für $t \ll t_x$

$$C_N t - C_{No} = K_1 C_K C_A t \quad \text{oder}$$

$$\text{Neigung 1} = K_1 C_K C_A$$

für $t > t_x$

$$C_N t - C_{No} = K_1 C_K C_A t - K_2 \int_0^{t_x} C_{AK} dt - K_2 C_{AKx} (t - t_x)$$

Oder wenn beide Werte für t_1 und t_2 größer als t_x sind:

$$\begin{aligned} C_{N2} - C_{N1} &= K_1 C_K C_A (t_2 - t_1) - K_2 C_{AKx} (t_2 - t_1) \\ &= K_3 C_{AKx} (t_2 - t_1) \end{aligned}$$

$$\text{Neigung 2} = \text{Neigung 1} - h_2 C_{AKx}$$

$$\text{Neigung 2} = K_3 C_{AKx}$$

K_3 ist die Geschwindigkeitskonstante des irreversiblen Zerfalls der Schiffischen Base.

Die einzelnen Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten lassen sich daher aus den angeführten Gleichungen wie folgt bestimmen:

$$K_1 = \frac{\text{Neigung 1}}{C_A \times C_K}$$

$$K_2 = \frac{\text{Neigung 1} - \text{Neigung 2}}{C_{AKx}}$$

$$K_3 = \frac{\text{Neigung 2}}{C_{AKx}}$$

Die Abbildungen 9, 10 und 11 illustrieren die Ableitung der kinetischen Gleichungen und vervollständigen die Betrachtungen, die zur Aufstellung der oben angeführten Geschwindigkeitskonstanten führen.

Die vorliegende mathematische Interpretation ist dann korrekt, wenn man die Konzentration der Hexosen oder ihres sauren Umwandlungsproduktes als konstant ansieht und man weiterhin postuliert, daß das Löslichkeitsprodukt der Aminosäure während der Reaktion als konstant angesehen werden kann.

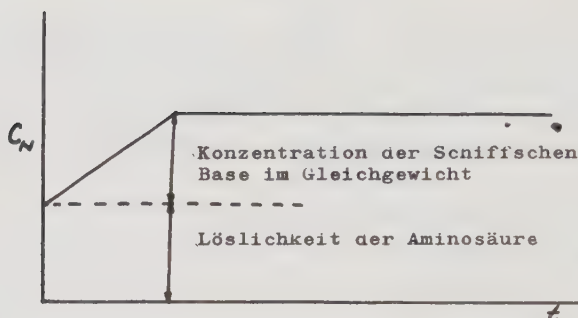


Abb. 9 Reversibler Zerfall der Schiff'schen Base

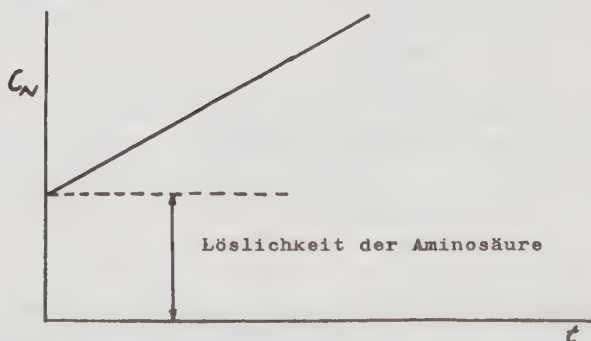


Abb. 10 Die Schiff'sche Base ist stabil, oder zerfällt in Verbindungen, in denen die ursprüngliche Aminosäure nicht mehr auftritt.

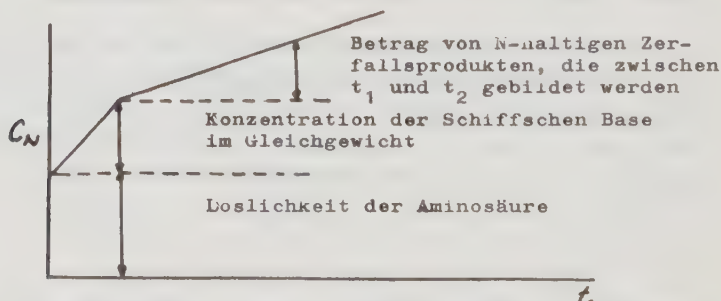


Abb. 11 Die Schiff'sche Base zerfällt; von den Zerfallsprodukten enthalten einige Stickstoff.

Gestützt auf die experimentellen Beobachtungen darf man annehmen, daß, wenn der Zerfall der Schiffischen Base im Hinblick auf den einen Reaktionsteilnehmer reversibel vor sich geht, dies auch für den z w e i t e n Reaktionspartner zutrifft.

Einleitend wurde hervorgehoben, daß die Konzentration der Hexosen (D-Glukose und D-Fruktose) während der Reaktion konstant sei. Um diese Forderung zu erfüllen, arbeitet man mit einem großen Überschuß an dieser Komponente. Bei den untersuchten Reaktionen betrug daher das Verhältnis der Aminosäure zur Aldehydverbindung ungefähr 1 : 7,5.

Trotzdem wird man in der ersten Phase der Reaktion mit einer geringen Konzentrationsveränderung der eingesetzten Zucker rechnen müssen. In der zweiten Phase bleibt die Konzentration konstant, wenn die Hydrolyse der Schiffischen Base eine vollständige ist. Tritt jedoch nur eine teilweise Hydrolyse ein, dann ist die Abnahme der Kohlenhydratkonzentration gleich der Bildung von irreversiblen Zerfallsprodukten.

Die experimentell gefundenen Werte erlauben einen Vergleich der Reaktionsgeschwindigkeit verschiedener Aminosäuren mit D-Glukose, D-Fruktose und 5-Hydroxymethylfurfural unter gleichen Reaktionsbedingungen.

Tritt eine Reaktion ein, so lassen sich mit den experimentell gefundenen Werten Kurven aufstellen, deren zwei lineare Teile durch eine Kurve miteinander verbunden sind. Damit ist der experimentelle Beweis erbracht, daß die oben abgeleiteten hypothetischen Reaktionstypen im wesentlichen durch das Experiment belegt werden können.

Bei der Bestimmung von K_1 wird eine kleine empirische Korrektur angebracht, indem für die Kohlenhydratkonzentration C_K der Wert $C_K - 1/2C_{AKx}$ eingesetzt wird.

Wie aus den Gleichungen (8) und (9) hervorgeht, geht der Wert für C_K nicht direkt in die Geschwindigkeitskonstanten K_2 und K_3 ein.

Methoden der quantitativen Stickstoffbestimmung

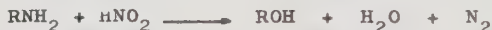
Es wurden Parallelbestimmungen vorgenommen, von denen die eine auf der Mikrobestimmung nach K j e l d a a n l (109), die andere auf der nach van S l y k e (110) beruht.

Auf letztere Methode wird im folgenden näher eingegangen.

Volumetrische Bestimmung des Aminostickstoffs nach van Slyke

Prinzip der Methode:

Es ist bekannt, daß aliphatische Aminogruppen mit salpetriger Säure nach folgender Gleichung reagieren:



Da bei dieser Reaktion der Stickstoff in Gasform auftritt, kann sich kein Gleichgewicht dabei ausbilden und der Prozeß läuft quantitativ von links nach rechts ab.

Nach dieser Methode ist es möglich, die Bestimmung von α - Aminosäuren in wenigen Minuten auszuführen.

Die salpetrige Säure zersetzt sich in saurer Lösung von selbst unter Bildung von Stickoxyd. Diese Reaktion wird hierbei benutzt, um alle Luft aus dem Apparat mittels des Stickoxydes zu verdrängen. Ist dies geschehen, wird die Aminolösung eingeführt, worauf eine gleichzeitige Entwicklung von Stickstoff und Stickoxyd stattfindet. Das Oxyd wird durch alkalische Permanganatlösung absorbiert und der reine Stickstoff darauf in einer besonderen Glasbürette gemessen.

Reagentien

K a l i u m p e r m a n g a n a t (p.a.) Es ist zweckmäßig, eine konzentrierte alkalische Permanganatlösung zu verwenden, da diese schnell das Stickoxyd zu Nitrat oxydiert. Man benutzt eine Lösung, die 50 g KMnO_4 und 25 g KOH im Liter enthält. Da die alkalische Lösung sowohl Kohlensäure als auch Stickstoffoxyd absorbiert, so beeinträchtigt die Gegenwart von Carbonat in der Aminolösung die Genauigkeit der Bestimmung nicht.

Natriumnitrit (p.a.) Für die Zersetzung der Aminokomponente wird ein großer Überschuß von Nitrit gewählt, aus dem die salpetrige Säure durch eine äquivalente Menge einer schwachen Säure (Essigsäure) in Freiheit gesetzt wird. Der große Überschuß des Reagenzes führt die Reaktion rasch zu Ende. Man verwendet eine Lösung, die 30 g NaNO_2 in 100 ml H_2O enthält.

Eisessig (p.a.) Der Gebrauch einer schwachen Säure an Stelle von Mineralsäuren, die bei früheren Methoden benutzt wurde, verursacht die Entwicklung von verhältnismäßig kleinen Volumina an Stickoxyd und läßt außerdem nicht befürchten, daß bei komplexen proteolytischen Produkten eine Säurehydrolyse eintreten kann.

Zur Reinigung der Apparatur und der Einfüllbürette verwendet man noch Chromschwefelsäure und Methylalkohol.

Apparatur:



Abb.: 12 Apparatur nach van Slyke

Verunreinigung der Reagentien

Das käufliche Natriumnitrit enthält oft Verunreinigungen, die beim Ansäuern des Salzes Spuren von Stickstoff entwickeln. Die nitritthaltige Lösung wird daher immer in einem Blindversuch auf ihre Reinheit überprüft und, wenn nötig, eine Korrektur für das Reagens angebracht. Diese ist bei den einzelnen Resultaten in Betracht zu stellen.

Reaktionsfähigkeit verschiedener Aminosäuren unter den Bedingungen der Bestimmung

Fassen wir die nach der van S l y k e Methode gefundenen Resultate zusammen, so ergibt sich folgendes: Jede bekannte α -Aminosäure reagiert bei Zimmertemperatur innerhalb von 5 Minuten quantitativ mit ihrem Stickstoffatom. Lysin erfordert 30 Minuten, bis zur vollständigen Umsetzung, weil die ϵ -Aminogruppe träger als die α -Aminogruppe reagiert. Prolin und Oxyprolin gehen überhaupt keine Umsetzung ein; Tryptophan reagiert mit der Hälfte, Histidin mit einem Drittel und Arginin mit einem Viertel des Gesamtstickstoffs.

Die Analysenresultate sind mittels des beschriebenen Verfahrens bei allen Aminosäuren absolut genau, mit Ausnahme des Glykokolls und des Cystins. Die beiden genannten Säuren unterliegen einer weiteren Zersetzung. Sie liefern neben Spuren von CO_2 auch andere Gase, die nicht durch alkalische Permanganatlosung absorbiert werden. Die vom Glykokoll gelieferte Gasmenge beträgt gewöhnlich 103 % der theoretisch berechneten Menge, beim Cystin sind es sogar 107 %. Das Resultat ist dabei dasselbe, ob man die Reaktion nur 5 Minuten oder eine halbe Stunde verlaufen läßt.

Experimentelle Durchführung der Methode

Die Anwendung und Gültigkeit der Methode für kinetische Studien der Maillard Reaktion ist abhängig von der *S c h n e l l i g - k e i t*, mit der sich ein Lösungsmittel (aqua bidest) an einer Aminosäure sättigt. Ist die "Sättigungszeit" groß, dann kann C_A während der Reaktion nicht als *k o n s t a n t* angesehen werden. Dies hätte aber einen Reaktionsverlauf zur Folge, der sich nicht mehr durch die einfachen Gesetzmäßigkeiten und ihre Aussagen beschreiben ließe.

Es werden verschiedene Aminosäuren auf ihre Fähigkeit, in kurzer Zeit ihre Sättigungskonzentration zu erreichen, überprüft.

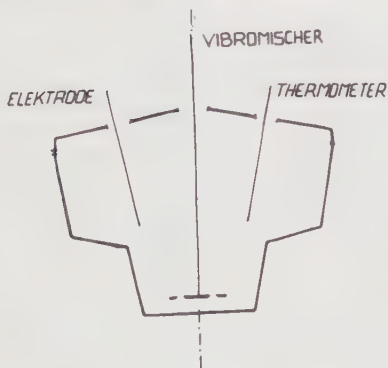


Abb.: 13 Reaktionsgefäß

Ein Reaktionsgefäß (siehe Abb.13) wird mit bidestilliertem Wasser ungefähr zur Hälfte gefüllt und in einem Wasserbad von $70,0 + 0,2^{\circ} \text{C}$ eingebracht (elektr. Thermostat). Hat dieses Wasser die Temperatur der Umgebung angenommen, gibt man die zu untersuchende Aminosäure im Überschuß hinzu und rührt heftig um. Letzteres wird zweckmäßig durch einen Vibromischer erreicht, dessen unterer Teil mit einer kautschukartigen Masse überzogen wurde,

um ein in Lösung gehen von Metallspuren zu vermeiden.

Unter fortwährendem Rühren werden zu verschiedenen Zeiten mit Hilfe einer Pipette Proben entnommen und ihr Stickstoffgehalt nach der van Slykschen Methode bestimmt. Die Einsaugöffnung der Pipette ist mit einem Wattepfropfen verschlossen, um die suspendierten festen Aminosäure-Kristalle aus der Lösung herauszufiltern.

Tab. 14: Sättigungskonzentration einiger Aminosäuren in
Abhängigkeit von der Zeit (70° C)

Aminosäure	Zeit Minuten	Millimol Aminosäure/ml
L-Asparaginsäure (40° C)	10	0,0219
	15	0,0411
	20	0,0495
	30	0,0621
	40	0,0737
	50	0,0860
	60	0,0955
	70	0,0955
L-Asparaginsäure	5	0,142
	20	0,172
	36	0,194
	45	0,194
L-Glutaminsäure	7	0,258
	20	0,360
	35	0,390
	45	0,390
DL-Tryptopnan	5	0,060
	12	0,074
	25	0,080
	37	0,083
	50	0,083
L-Leucin	5	0,122
	20	0,295
	35	0,306
	50	0,316
	60	0,316
DL-Phenylalanin	5	0,276
	12	0,297
	20	0,316
	32	0,325
	40	0,325
L-Tyrosin	7	0,011
	20	0,014
	30	0,017
	40	0,019
	65	0,022
	75	0,022

Die Werte der Tabelle 14 zeigen, daß sich in wässriger Lösung die Sättigungskonzentration verschiedener Aminosäuren in **a u s - r e i c h e n d** kurzer Zeit einstellt. Diese Eigenschaft erlaubt es, die beschriebene Arbeitsmethode zur Untersuchung kinetischer Studien heranzuziehen. Die Zeit, in der sich das Sättigungsgleichgewicht einstellt, hängt vom Grad der erreichten Suspension ab. Für unsere Versuche wurde ein Vibromischer verwendet.

Es wurde bereits erwähnt, daß in einer Hexose- bzw. DMF-Lösung, die an einer Aminosäure gesättigt ist, die Reaktionsgeschwindigkeit **d i r e k t** proportional der Zunahme des Stickstoffgehaltes der Lösung ist. Wir wählten für unsere Experimente folgende Versuchsanordnung:

Bioestilliertes Wasser wird in ein Reaktionsgefäß gebracht und in einem Thermostaten auf konstanter Temperatur gehalten. Die Aminosäure wird hinzugefügt (in ausreichender Menge, um die Sättigung herbeizuführen und die umgesetzte Aminosäure zu ergänzen) und kräftig gerührt. Hat sich das Sättigungsgleichgewicht eingestellt, wird der zweite Reaktionspartner hinzugegeben. Die Konzentration der Lösung an demselben ist 1,70 mol.

Dann werden zu verschiedenen Zeiten Proben entnommen und in Parallelversuchen ihr Gesamtstickstoff nach Kjeldahl und ihr Aminostickstoff nach van Slyke bestimmt.

Die folgenden Tabellen und Abbildungen geben einen Überblick über das Reaktionsvermögen der eingesetzten Partner. Trägt man den Aminostickstoff (millimol/ml) gegen die Zeit (Minuten) in einem Diagramm auf, so erhält man zwei gerade Linien. Ihr Schnittpunkt ergibt die Konzentration der stationären Phase.

Die experimentell gefundenen Werte beweisen, daß das aufgestellte Reaktionsschema im wesentlichen zutrifft.

Tab. 15: Stickstoffgehalt *) einer wässrigen 1,70 mol. D-Glukose- und bei $70 \pm 0,2^\circ$ C gesättigten L-Glutaminsäure-Lösung

Zeit (Min)	pH	L-Glutaminsäure millimol/ml	
		van Slyke	Kjeldahl
30	3,15	0,353	0,365
60	3,15	0,353	0,365
120	3,15	0,353	0,364
180	3,15	0,352	0,364
240	3,15	0,353	0,364
360	3,15	0,353	0,367
480	3,15	0,354	-
690	3,12	0,353	0,368
1140	3,12	0,354	-
1440	3,10	0,352	0,374

Tab. 16: Stickstoffgehalt einer wässrigen 1,70 mol. D-Fruktose- und bei $70 \pm 0,2^\circ$ C gesättigten L-Glutaminsäure-Lösung

Zeit (Min)	pH	L-Glutaminsäure millimol/ml	
		van Slyke	Kjeldahl
30	3,20	-	0,356
60	3,20	0,349	0,350
120	3,20	0,349	0,349
180	3,20	0,350	0,349
300	3,20	0,350	0,350
480	3,20	0,351	0,352
660	3,15	0,351	0,352
840	3,15	0,352	0,353

*) In allen Tabellen auf die Konzentration der jeweiligen Aminosäuren umgerechnet

Tab. 17: Stickstoffgehalt einer wässrigen 1,7 mol. 5-Hydroxymethylfurfurol- und bei $70 \pm 0,3^\circ \text{C}$ gesättigten L-Glutaminsäure-Lösung

Zeit (Min)	pH	L-Glutaminsäure millimol/ml	
		van Slyke	Kjeldahl
30	3,30	0,350	0,352
73	3,30	0,385	-
104	3,30	0,397	-
164	3,25	0,443	0,450
224	3,25	0,482	-
284	3,25	0,524	0,531
344	3,25	0,553	-
404	3,25	0,580	-
464	3,25	0,590	0,600
524	3,25	0,609	-
644	3,25	0,631	0,649
764	3,25	0,664	0,664
884	3,25	0,693	0,701
994	3,25	0,717	-
1244	3,25	0,770	-

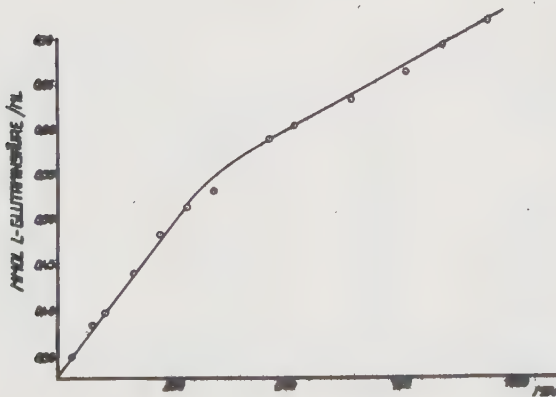


Abb.: 14 Reaktionsverlauf einer wässrigen 1,70 mol HMF- und bei $70 \pm 0,3^\circ \text{C}$ gesättigten L-Glutaminsäure-Lösung

Tab. 18: Stickstoffgehalt einer wässrigen 1,70 mol. D-Glukose- und bei $70 \pm 0,3^\circ \text{C}$ gesättigten L-Asparaginsäure-Lösung

Zeit (Min)	pH	L-Asparaginsäure millimol/ml	
		van Slyke	Kjeldahl
45	3,40	0,188	0,189
90	3,40	0,190	0,190
120	3,40	0,190	-
160	3,40	0,188	0,190
240	3,35	0,190	-
300	3,35	0,190	0,194
540	3,35	0,194	0,195
840	3,30	0,195	0,192
1020	3,30	0,197	-
2320	3,30	-	0,200

Tab. 19: Stickstoffgehalt einer wässrigen 1,70 mol. D-Fruktose- und bei $70 \pm 0,3^\circ \text{C}$ gesättigten L-Asparaginsäure-Lösung

Zeit (Min)	pH	L-Asparaginsäure millimol/ml	
		van Slyke	Kjeldahl
30	3,40	0,205	-
45	3,40	-	0,221
105	3,40	0,207	0,222
285	3,40	0,213	0,221
405	3,35	0,216	0,220
600	3,35	0,225	0,209
960	3,30	0,230	0,230
1620	3,30	0,199	-

Tab. 20: Stickstoffgehalt einer wässrigen 1,70 mol. 2-hydroxymethylfurfurol- und bei $70 \pm 0,2^\circ \text{C}$ gesättigten L-Asparaginsäure-Lösung

Zeit (Min)	pH	L-Asparaginsäure millimol/ml	
		van Slyke	Kjeldahl
15	3,40	-	0,154
30	3,40	0,152	-
60	3,40	-	0,165
120	3,40	0,173	0,178
180	3,40	0,184	0,190
300	3,40	0,208	0,216
420	3,35	0,226	0,231
630	3,35	0,236	-
720	3,30	-	0,245
780	3,30	0,243	-
900	3,30	0,247	-

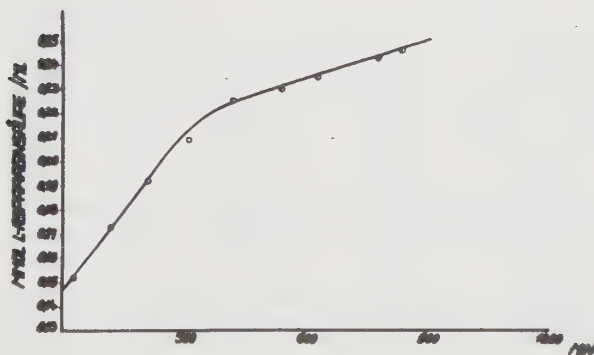


Abb.: 15 Reaktionsverlauf einer wässrigen 1,70 mol. HMF- und bei $70 \pm 0,2^\circ \text{C}$ gesättigten L-Asparaginsäure-Lösung

Tab. 21: Stickstoffgehalt einer wässrigen 1,70 mol. D-Glukose- und bei $70 \pm 0,2^\circ \text{C}$ gesättigten DL-Tryptophan-Lösung

Zeit (Min)	pH	DL-Tryptophan millimol/ml	
		van Slyke	Kjeldahl
30	4,45	0,119	0,115
65	4,45	0,117	0,115
150	4,40	0,118	0,112
240	4,40	0,118	0,119
300	4,40	-	0,118
360	4,40	0,119	-
540	4,35	0,117	0,119
720	4,35	0,117	0,210
900	4,30	0,140	0,226

Tab. 22: Stickstoffgehalt einer wässrigen 1,70 mol. D-Fruktose- und bei $70 \pm 0,2^\circ \text{C}$ gesättigten DL-Tryptophan-Lösung

Zeit (Min)	pH	DL-Tryptophan millimol/ml	
		van Slyke	Kjeldahl
30	4,70	0,118	0,123
105	4,65	0,117	0,121
165	4,60	0,117	0,121
270	4,55	0,118	0,122
360	4,55	0,119	-
480	4,50	0,117	0,124
660	4,45	0,119	0,127
900	4,45	0,120	0,126

Tab. 23: Stickstoffgehalt einer wässrigen 1,70 mol. 5-Hydroxymethylfurfurol- und bei $70 \pm 0,3^{\circ}\text{C}$ gesättigten DL-Tryptophan-Lösung

Zeit (Min)	pH	DL-Tryptophan millimol/ml	
		van Slyke	Kjeldahl
30	3,75	0,284	0,302
90	3,70	0,297	0,316
120	3,70	0,301	0,322
180	3,70	-	0,333
240	3,70	0,304	0,343
300	3,65	0,307	-
360	3,65	0,305	0,371
480	3,60	0,305	-
600	3,55	0,304	-



Abb.: 16

Reaktionsverlauf einer wässrigen 1,70 mol. HMF- und bei $70 \pm 0,3^{\circ}\text{C}$ gesättigten DL-Tryptophan-lösung

Tab. 24: Stickstoffgehalt einer wässrigen 1,70 mol. D-Glukose- und bei $70 \pm 0,2^\circ \text{C}$ gesättigten DL-Phenylalanin-Lösung

Zeit (Min)	pH	DL-Phenylalanin millimol/ml	
		van Slyke	Kjeldahl
45	4,45	0,288	0,286
90	4,40	0,290	0,291
180	4,40	0,290	0,292
300	4,35	0,291	0,297
450	4,35	0,292	0,316
660	4,30	0,293	0,314
840	4,30	0,289	0,312

Tab. 25: Stickstoffgehalt einer wässrigen 1,70 mol. D-Fruktose- und bei $70 \pm 0,2^\circ \text{C}$ gesättigten DL-Phenylalanin-Lösung

Zeit (Min)	pH	DL-Phenylalanin millimol/ml	
		van Slyke	Kjeldahl
30	4,70	0,286	0,249
60	4,70	0,287	0,251
120	4,70	0,289	0,254
180	4,65	-	0,254
240	4,65	0,318	0,252
360	4,65	0,300	0,253
480	4,60	0,321	-
660	4,55	0,357	0,267
840	4,50	0,338	0,230

Tab. 26: Stickstoffgehalt einer wässrigen 1,70 mol. 2-hydroxymethylfurfurol- und bei $70 \pm 0,2^\circ \text{C}$ gesättigten DL-Phenylalanin-Lösung

Zeit (Min)	pH	DL-Phenylalanin millimol/ml	
		van Slyke	Kjeldahl
30	4,10	0,465	0,456
90	4,00	0,470	-
120	4,00	0,479	0,484
150	4,00	0,487	-
240	4,00	0,489	0,492
390	4,00	0,496	-
480	4,00	-	0,502
570	3,95	0,504	0,504
720	3,95	0,506	0,505

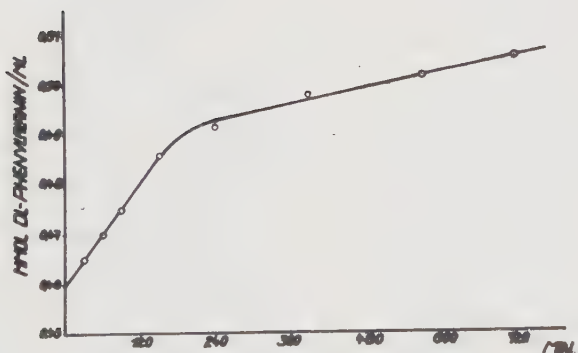


Abb.: 17 Reaktionsverlauf einer wässrigen 1,70 mol HMF- und bei $70 \pm 0,2^\circ \text{C}$ gesättigten DL-Phenylalanin-Lösung

Tab. 27: Stickstoffgehalt einer wässrigen 1,70 mol. D-Glukose- und bei $70 \pm 0,2^\circ \text{C}$ gesättigten L-Tyrosin-Lösung

Zeit (Min)	pH	L-Tyrosin millimol/ml	
		van Slyke	Kjeldahl
30	3,05	0,0573	0,0620
60	3,05	0,0573	0,0619
120	3,05	0,0573	0,0620
180	3,05	0,0573	0,0621
270	3,05	0,0576	-
480	3,05	0,0580	-
570	3,00	0,0560	0,0631
660	3,00	0,0540	-

Tab. 28: Stickstoffgehalt einer wässrigen 1,70 mol. D-Fruktose- und bei $70 \pm 0,2^\circ \text{C}$ gesättigten L-Tyrosin-Lösung

Zeit (Min)	pH	L-Tyrosin millimol/ml	
		van Slyke	Kjeldahl
30	4,50	0,0236	0,0318
60	4,50	0,0239	0,0317
120	4,45	0,0259	0,0314
180	4,35	0,0259	-
240	4,30	0,0266	0,0317
360	4,20	-	0,0316
480	4,15	0,0250	0,0333
660	3,95	0,0300	0,0339

Tab. 29: Stickstoffgehalt einer wässrigen 1,70 mol. D-Glukose- und bei $70 \pm 0,2^\circ$ C gesättigten L-Leucin-Lösung

Zeit (Min)	pH	L-Leucin millimol/ml	
		van Slyke	Kjeldahl
30	4,30	0,287	0,295
60	4,25	0,286	0,285
120	4,25	0,285	0,296
180	4,20	0,285	-
240	4,15	0,285	0,297
360	4,00	0,282	0,299
480	4,00	0,290	0,312
600	4,00	0,299	0,330
780	4,00	0,324	0,378

Tab. 30: Stickstoffgehalt einer wässrigen 1,70 mol. D-Fruktose- und bei $70 \pm 0,2^\circ$ C gesättigten L-Leucin-Lösung

Zeit (Min)	pH	L-Leucin millimol/ml
		van Slyke
30	4,30	0,278
60	4,30	0,280
150	4,20	0,280
240	4,10	0,276
360	4,00	0,284
480	4,00	0,281
660	3,90	0,282
810	3,90	0,290

Tab. 31: Stickstoffgehalt einer 1,70 mol. 5-Hydroxymethylfurfurol-Lösung, die bei $40 \pm 0,3^{\circ}$ C an L-Leucin gesättigt ist

Zeit (Min)	pH	L-Leucin millimol/ml
		van Slyke
15	4,75	0,256
60	4,75	0,253
120	4,75	0,255
180	4,75	0,255
300	4,75	0,257
600	4,70	0,256
1000	4,70	0,259
1400	4,70	0,264
1800	4,70	0,263
2400	4,70	0,262
2800	4,70	0,264
3000	4,70	0,258



Abb.: 18 Reaktionsverlauf einer 1,70 mol. HMF-Lösung, die bei $40 \pm 0,3^{\circ}$ C an L-Leucin gesättigt ist

Tab. 32: Stickstoffbestimmung einer wässrigen 1,70 mol. D-Glukose und 0,44 mol. L-Histidin-Lösung ($70 \pm 0,3^\circ \text{C}$)

Zeit (Min)	pH	L-Histidin millimol/ml	
		van Slyke	Kjeldahl
30	0,95	-	0,442
45	0,95	0,430	-
135	0,90	0,313	-
175	0,90	0,299	-
255	6,90	0,234	-
380	6,90	0,185	0,440
505	6,90	0,178	-
705	6,90	0,173	-
825	6,90	0,170	0,440
945	6,90	0,169	-
1300	6,90	0,163	0,443
1740	6,90	0,160	-

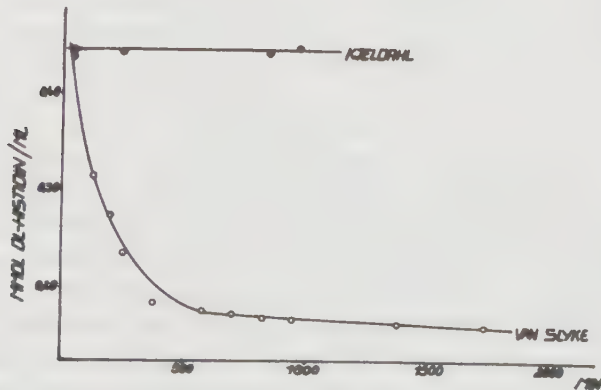


Abb.: 19 Reaktionsverlauf einer wässrigen 1,70 mol. D-Glukose- und 0,44 mol. L-Histidin-Lösung ($70 \pm 0,3^\circ \text{C}$)

Ergebnis:

Mehrere Systeme wurden unter Beibehaltung der beschriebenen Arbeitsmethode untersucht. Die experimentell gefundenen Daten sind aus den Tabellen und Abbildungen zu ersehen. Die mathematische Ableitung wird unter den gemachten Einschränkungen zur Berechnung der Geschwindigkeits- bzw. Zerfallskonstanten K_1 , K_2 und K_3 herangezogen. Im Hinblick auf die festgestellte geringe Geschwindigkeit der Reaktion wurden Minuten als Zeiteinheit gewählt.

Vergleich der beiden Stickstoff-Bestimmungsmethoden:

Zur Anwendung kam die Bestimmung primärer Aminoverbindungen nach van Slyke und die Stickstoff-Totalbestimmung nach Kjeldahl. Ein Vergleich beider Methoden ergibt sich aus den Tabellen 15 - 31. Demnach werden von beiden Methoden innerhalb der Fehlergrenze und einer Reaktionsdauer bis ungefähr 8 Stunden übereinstimmende Werte geliefert. Dies gilt sowohl für die Stickstoff-Bestimmung aus D-Glukose- und D-Fruktose-Lösungen als auch in HMR-Lösungen. Eine Ausnahme finden wir beim L-Histidin und dem DL-Tryptophan. Wie die Tabelle 32 zeigt, ist schon zu Beginn der betrachteten Histidin-Glukose-Reaktion eine Stickstoffbestimmung nach van Slyke nicht mehr möglich, während beim Tryptophan erst nach 2 Stunden Abweichungen der volumetrischen Werte sichtbar werden. Man muß daher annehmen, daß sich in den bräunlich gefärbten Lösungen Schiffsbasen bilden, die unter den Bedingungen der sauren Hydrolyse nicht mehr reversibel zerfallen und daher durch die volumetrische Methode nicht erfaßt werden können. Hat man durch Versuche festgestellt, daß die Anwendung der gasometrischen Aminostickstoffbestimmung erlaubt ist, so wird man ihr aufgrund der guten Reproduzierbarkeit der Werte und der Kürze der Ausführung den Vorzug gegenüber der Methode nach Kjeldahl geben. Erstreckt sich die Reaktionsdauer über einen größeren Zeitraum, so erhält man wegen der Kompliziertheit des Reaktionsgemisches keine wahren Werte mehr. Sie liegen im allgemeinen zu tief (Tab. 21, 23, 32).

Vergleich der Reaktionsfähigkeit der untersuchten Carbonylverbindungen

Zur Anwendung kamen 1,70 mol. Lösungen von D-Glukose, D-Fruktose und 5-Hydroxymethylfurfural neben gesättigten Lösungen der Aminosäuren L-Asparaginsäure, L-Glutaminsäure, L-Tyrosin, DL-Phenylalanin, L-Leucin, DL-Tryptophan und L-Histidin.

Mit Ausnahme der basischen Aminosäure L-Histidin tritt bei 70° C keine Umsetzung der Hexosen mit den Aminosäuren ein (Tab. 15, 16, 18, 19, 21, 22, 24, 25, 27, 28). Selbst nach 10 Stunden ist erst ein geringer Anstieg des Stickstoffgehaltes der Lösung und damit ein Reaktionsbeginn zu erkennen. Wie jedoch nach später gezeigt wird, ist dieser nicht auf eine Umsetzung der Hexosen mit den Aminosäuren zurückzuführen. Diese Feststellung überrascht umso mehr, als man bislang die Auffassung vertreten hat, daß die Umsetzung der glykosidischen Gruppe eines Zuckers mit der Aminosäurekomponente einer Aminosäure als Maillard Reaktion anzusehen ist.

Greift man jedoch auf das Umwandlungsprodukt der Hexosen, auf das 5-Hydroxymethylfurfural, zurück, so erhält man folgendes Bild (Tab. 17, 20, 23, 26). Eindeutig und klar ist eine Umsetzung der beiden Reaktionspartner zu erkennen. Die Reaktionslösung färbt sich im Gegensatz zu dem Hexosen-Aminosäuresystem dunkel. Den quantitativen Reaktionsverlauf kann man an Hand der Tabellen 13, 14, 15 und 16 überblicken.

Deutlich erkennt man in Übereinstimmung mit der Theorie ein geradliniges Ansteigen der Stickstoffwerte der Lösung; dies ist aber gleichbedeutend mit der Bildung einer unbekannten Verbindung, die in dieser Arbeit als Schiffische Base bezeichnet wird. Im weiteren Verlauf erfährt die Gerade einen Knick. Ihr Anstieg ist flacher geworden. Die Schiffische Base (deren Bildungskonstante durch K_1 ausgedrückt wird) erleidet hier eine teilweise reversible Hydrolyse (Zerfallskonstante K_2). Man darf erwarten, daß diese zumindestens im Hinblick auf die Aminosäure reversibel ist. Der Schnittpunkt der beiden Geraden ergibt die Konzentration der Schiffischen Base im stationären Zustand (vergleiche S. 72, Abb. 11: Hypothetische Annahme des Reaktionsverlaufes nach den drei möglichen Arten).

Diesem Schema und der erfolgten Interpretation ordnet sich der experimentell verfolgte Reaktionsablauf des Systems

L-Glutaminsäure	-	5	-	Hydroxymethylfurfurol
L-Asparaginsäure	-	5	-	Hydroxymethylfurfurol
und DL-Phenylalanin	-	5	-	Hydroxymethylfurfurol

in befriedigender Weise ein.

Das ebenso experimentell untersuchte System DL - Tryptophan - HMF zeigt einen anderen Mechanismus und verläuft analog dem auf Seite 72, Abb. 10 postulierten. Die mit Hilfe der Kjeldahl-Methode gefundenen Werte ergeben einen geradlinig ansteigenden Reaktionsverlauf. Die hierbei gebildete Schiff'sche Base ist also s t a b i l und zerfällt nicht. Die Reaktionszeit betrug 6 Stunden. Die Farbe der Reaktionslösung ist schwarzgrün.

Die Abbildung 16 zeigt in anschaulicher Weise den Unterschied beider N-Bestimmungsmethoden. Nach van Slyke erhält man zu Beginn der Reaktion ebenfalls einen geradlinig ansteigenden Reaktionsverlauf. Doch etwa nach 2 Stunden biegt die Gerade ab und verläuft parallel zur Zeitachse. Die gebildeten Reaktionsprodukte werden in der van Slykschen Apparatur nicht mehr vollständig hydrolytisch gespalten. Die erhaltenen Stickstoffwerte sind zu niedrig.

Die Temperatur ist von wesentlichem Einfluß für den Ablauf der untersuchten Systeme. Die Tabelle 31 zeigt, daß bei 40° C in einer L-Leucin- HMF - Lösung nach 50 Stunden noch keine nennenswerte Umsetzung stattgefunden hat, während bei 70° C diese schon unmittelbar einsetzt.

Tab. 33: Geschwindigkeitskonstanten einiger Aminosäure-HMF-Systeme

System	Anfangs- acidität (pH)	Temp. °C	Anfangs- konzentrt. Aminosäure mmol/l C	Anion. konzentrt. mmol/l C _A	Konzentrt. Schiff.- Base mmol/l C _{AK}	K ₁	K ₂	K ₃
L-Glutaminsäure 1,70 mol. HMF	3,30	70,0	330	36,1	235	$6,71 \times 10^{-5}$	$2,15^{-3} \times 10$	$1,25 \times 10^{-3}$
L-Asparaginsäure 1,70 mol. HMF	3,55	70,0	144	70,5	79	$2,50 \times 10^{-5}$	$2,47 \times 10^{-3}$	$8,76 \times 10^{-3}$
DL-Tryptophan 1,70 mol. HMF	3,75	69,8	277	38,9	28	$2,31 \times 10^{-5}$	-	-
DL-Phenylalanin 1,70 mol. HMF	4,10	58,9	460	94,2	29	$6,46 \times 10^{-6}$	$8,03 \times 10^{-3}$	$1,62 \times 10^{-3}$

Ergebnis:

In der Tabelle sind einige Werte zusammengestellt. Aus diesen und der jeweiligen Neigung der betreffenden Geraden lassen sich die Geschwindigkeitskonstanten

- K_1 = Bildungskonstante der Schiffschen Base
- K_2 = Zerfallskonstante der Schiffschen Base, die im Hinblick auf die Aminosäure reversibel angenommen wird
- K_3 = Reaktionskonstante für den irreversiblen Zerfall der Schiffschen Base

annähernd berechnen. Dabei wurden einige vereinfachende Annahmen unterstellt. Die pK -Werte wurden aus Tabellenwerken *) entnommen; es wurde weder der Temperatureinfluß auf die Dissoziationskonstante noch die Verwendung einer 1,70 mol. HMF-Lösung anstelle reinen Wassers berücksichtigt.

Zur Berechnung der Aminosäure wurde die Gleichung nach Henderson-Hasselbalch ($pH = pK + \log \frac{C_A}{C_{HA}}$) herangezogen. Dieses Gesetz

ist ein Grenzgesetz, welches ohne Korrektur nur für ideal verdünnte Lösungen gilt.

Korrekterweise müßte auch hierbei an Stelle der Konzentration C_A und C_{HA} die Aktivitäten a_A und a_{HA} treten.

Solange es jedoch nicht gelingt, die Dissoziationskonstanten der Aminosäuren bei 70° C exakt zu bestimmen, braucht man auch eine Korrektur der Konzentrationen nicht vorzunehmen.

Bei einer Betrachtung der Gleichungen 7, 8 und 9 sieht man, daß nur die Bestimmung von K_1 auf C_A (als errechneten Wert) zurückzugreifen braucht; K_2 und K_3 sind unabhängig von C_A und lassen sich direkt aus den bei den Versuchen ermittelten Daten bestimmen. Hierfür sind nur die Neigungen der Geraden 1 und 2 sowie die Konzentration der Schiffschen Base notwendig.

Die K_1 -Werte, die sich auf die Bildung der Schiffschen Base beziehen, enthalten mit Ausnahme des Phenylalanins ($\times 10^{-6}$) alle den gleichen Faktor 10^{-5} . Das System L-Glutaminsäure - HMF ergibt den höchsten K_1 -Wert, gefolgt von L-Asparaginsäure - HMF, DL-Tryptophan-HMF und DL-Phenylalanin-HMF. Die Werte für K_2 und K_3 sind etwa 100 mal so gross wie die für K_1 .

*) Hodgman and Rist "Handbook of Chemistry and Physics" (1959)

Einfluß von Natriumhydrogensulfit auf die Bräunungsreaktion

Es ist schon seit langem bekannt, daß durch Zugabe von schwefeliger Säure die nicht enzymatische Bräunungsbildung gehemmt oder gar verhindert werden kann. Durch Anlagerung des Sulfitanions an die Carbonylverbindung entstehen im allgemeinen schwer lösliche Additionsverbindungen. Bei diesen ist die aktive Carbonylgruppe blockiert und die Verbindung kann daher nicht mehr reagieren.

0,5 mol. wässrige Hydroxymethylfurfurol-Lösungen wurden bei 70° C mit steigenden Mengen an Hydrogensulfit versetzt und der Reaktionsverlauf des Systems nach eingangs beschriebener Art verfolgt.

Ergebnis:

Das Maß der Bräunung ist direkt abhängig vom Molverhältnis der vorliegenden Reaktionspartner HMF : HSO_3^- d. h., je weniger HSO_3^- vorliegt, umso schneller verläuft die Reaktion und damit die Bräunung. Es konnte gezeigt werden, daß bei einem Überschuß oder bei einem äquimolekularen Verhältnis von HSO_3^- : HMF **keine** Reaktion eintritt und daß, nach bereits eingetretener Reaktion, diese durch Zugabe von Natriumbisulfit gestoppt wird. Gleichzeitig damit wurde eine Farbaufhellung der Reaktionslösung beobachtet.

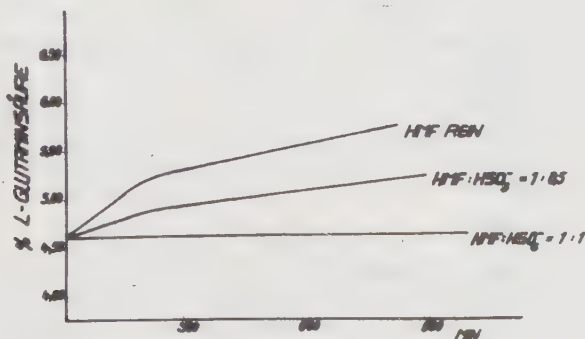


Abb.: 20 Einfluß von Natriumhydrogensulfit auf die Bräunungsreaktion

Vergleich der Bräunungsgeschwindigkeit und der Reaktionsgeschwindigkeit am Beispiel der L-Glutaminsäure und des 5-Hydroxymethylfurfurols

Verfärbt sich eine Zucker- bzw. HMF-Aminosäure-Lösung, so ist dies das Zeichen einer beginnenden Umsetzung der beiden Partner. Die Lösung färbt sich mit zunehmender Reaktionsdauer über gelb, braun nach dunkelbraun. Es liegt nahe, die Farbvertiefung der Reaktion messend zu verfolgen, um damit ein Maß der Reaktionsgeschwindigkeit zu erhalten. Die Eigenschaft wurde auch von verschiedenen Autoren (56,68,69,70) herangezogen und die optische Dichte einer Lösung (bei 420 oder 490 nm) in Abhängigkeit von der Zeit gemessen.

Für unseren Vergleich benützen wir die eingangs beschriebene Methode zur Messung der Geschwindigkeit und stellen die dabei erhaltenen Werte in einem Diagramm denjenigen der optischen Bestimmung gegenüber.

Eine bei 70° C 1,60 mol. 5-Hydroxymethylfurfurol-Lösung ist an L-Glutaminsäure gesättigt. Die Reaktionslösung färbt sich dabei langsam dunkelbraun. Zu verschiedenen Zeiten werden Proben entnommen und sowohl ihr N-Gehalt als auch ihre optische Dichte bestimmt.



Abb.: 21 Vergleich der Bräunungs- und Reaktionsgeschwindigkeit

Ergebnis:

In dem System L-Glutaminsäure-HMF wird bei $\text{pH} = 3,40$ in gewissen Zeitabständen die optische Dichte und ihr Stickstoffgehalt gemessen.

Aus der Abbildung 21 kann man ersehen, daß zu Beginn der Reaktion eine ganz gute Übereinstimmung der Werte aus den beiden Methoden vorliegt. Nach längerer Reaktionsdauer (etwa nach 7 Stunden) verschiebt sich das Bild. Während die Stickstoffwerte nicht mehr die gleiche Zuwachsrate wie zu Beginn aufweisen und kleiner werden, steigt die optische Dichte der Lösung steil an. Gilt das für die Reaktion zwischen der Aminosäure und dem Zucker bzw. dem HMF aufgestellte Reaktionsschema (es wurde durch das Experiment bewiesen), dann kann zumindestens für das L-Glutaminsäure-HMF-System die Verwendung der optischen Dichtemessung als Maß der Reaktionsgeschwindigkeit nur mit großer Vorsicht übernommen werden. Während zu Beginn der Reaktion eine angenäherte Übereinstimmung mit den "exakten" Werten vorliegt, trifft dies für den weiteren Verlauf nicht zu.

Die Bedeutung von 5-Hydroxymethylfurfurol für die Maillard Reaktion

In dieser Arbeit wurde der Beweis erbracht, daß unter den gegebenen Reaktionsbedingungen zwischen Hexosen und Aminosäuren **k e i n e** nachweisbare Reaktion eintritt. Verlängert man die Reaktionsdauer, so ist besonders bei Verwendung von D-Fruktose ein geringer Anstieg der gemessenen Stickstoffwerte festzustellen. Gleichzeitig tritt eine leichte Verfärbung der Reaktionslösung über gelb nach braungelb auf.

Es konnte weiterhin gezeigt werden, daß sich in Hexoselösungen in Gegenwart von Aminosäuren in beschleunigtem Maß **HMF** bildet. Die erzeugte Menge ist abhängig von Temperatur, Acidität und der Aminosäurekonzentration.

Es liegt nahe, diese beiden Aussagen zueinander in Beziehung zu bringen und aus ihr die Bedeutung des HMF für die Maillard Reaktion abzuleiten.

Tab. 34: Vergleichende Übersicht der Bildung von 5-Hydroxymethylfurfuralbildung in Aminosäure gesättigten 1,7 mol Hexoselösungen (70 ± 0,3 °C)

Aminosäure	Hexose	pH	5-Hydroxymethylfurfural (mmg/1000 ml)				
			Zeit (Std.)				
			1	3	5	7	21 *
L-Asparaginsäure	D-Glukose D-Fruktose	3,5 3,4	10,3 16,7	31,3 43,2	52,7 76,6	69,8 94,1	244 1357,0
L-Glutaminsäure	D-Glukose D-Fruktose	3,2 3,2	2,3 12,3	4,5 16,2	6,8 21,0	9,0 28,4	23,6 55,3
DL-Tryptophan	D-Glukose D-Fruktose	4,3 4,7	1,7 11,2	5,0 16,8	11,7 17,2	17,3 20,9	72,9 36,9
L-Leucin	D-Glukose D-Fruktose	4,7 5,5	- -	- -	- -	0,0 1,2	15,6 28,7
DL-Phenylalanin	D-Glukose D-Fruktose	4,9 5,2	- -	- -	- -	1,1 3,3	(0,6) (2,4)
L-Tyrosin	D-Glukose	3,0	-	-	1,0	3,1	(-)

*) Die in Klammern erscheinenden Werte stellen die HMF-Werte von den jeweiligen Blindlösungen dar (Puffer Citrat - HCL)

Tab.: 35 Stickstoffgehalt einer 1,70 mol. D-Glukose und D-Fruktoselösung, die bei $70 \pm 0,3^\circ \text{C}$ an L-Glutaminsäure gesättigt ist

Zeit (Min)	pH	D-Glukose	D-Fruktose
		L-Asparaginsäure millimol/ml	
		van Slyke	van Slyke
60	3,50	0,359	0,362
180	3,45	0,358	0,363
420	3,45	0,359	0,363
720	3,35	0,359	0,364
960	3,40	0,358	0,364
1320	3,35	0,362	0,365
2040	3,35	0,365	0,380
2400	3,35	0,375	-
3360	3,35	-	0,402
3840	3,35	-	0,451
4200	3,35	0,413	-
5400	3,30	0,450	-
6900	3,30	0,458	-

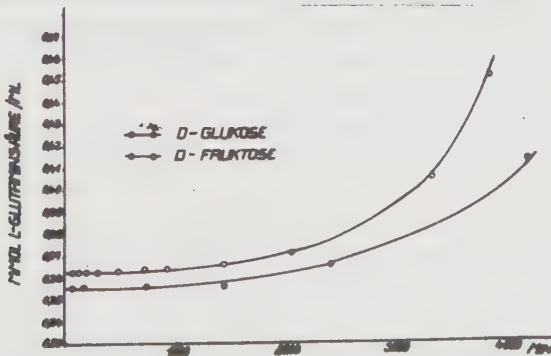


Abb.: 22 Reaktionsverlauf einer 1,70 mol D-Glukose und D-Fruktose-Lösung, die bei $70 \pm 0,3^\circ \text{C}$ an L-Glutaminsäure gesättigt ist

Ergebnis:

Faßt man die Ergebnisse der Tabellen 34 und 35 zusammen, so ergibt sich folgendes Bild:

Bei allen Versuchen ist die nachgewiesene Menge an HMF in mit individuellen Aminosäuren gesättigten Hexoselösungen größer als in aminosäurefreien Vergleichsproben. Auch hier geht, wie bei allen anderen Versuchen, die Bildung von HMF aus Fruktose-Lösungen schneller vor sich als in den D-Glukosevergleichslösungen.

Bei den beiden sauren Aminosäuren L-Asparaginsäure und L-Glutaminsäure tritt dieser Effekt besonders stark auf.

Die Tabelle 35 und die dazu gehörige Abbildung 22 zeigen in anschaulicher Weise, daß die Bräunungsreaktion erst nach einer längeren Induktionsperiode eintritt. Nach den gemachten Aussagen dürfen wir daher schließen, daß in einem Aminosäure-Hexose-System in einer Primärreaktion HMF gebildet wird. Dieses reagiert erst mit der Aminosäure. Diese Annahme und ihre experimentelle Bestätigung (Tab. 35) erklären die Tatsache, daß Aminosäure-Hexose-Lösungen beim Erhitzen über längere Zeit hinweg farblos bleiben und eine Bestimmung des Stickstoffs keinen Anstieg mit der Zeit zeigt. Später verfärbt sich die Reaktionslösung über gelb nach braun und die Stickstoffwerte steigen nun an.

Zusammenfassung
=====

Die vorliegende Arbeit berichtet über die Maillard Reaktion in saurem Milieu. Als Reaktionspartner dienen individuelle Aminosäuren: D-Glukose, D-Fruktose und γ -Hydroxymethylfurfurol (HMF).

Nichtenzymatische Bräunungsreaktion...

Die Farbintensität wässriger Hexose- oder HMF-Lösungen nimmt in Gegenwart von Aminosäuren mit steigender Temperatur und Reaktionszeit zu.

Bei einem Vergleich der Bräunungsgeschwindigkeit einer Glykokoli-Lösung mit D-Glukose-, D-Fruktose oder HMF bräunt sich letztere angenähert 6mal so schnell wie diejenige mit D-Fruktose und 6mal so schnell wie diejenige mit D-Glukose.

Die Bräunungsbildung tritt sowohl als Folgeerscheinung einer Aminosäure - Hexose - Reaktion, einer Aminosäure - HMF - Reaktion und einer HMF - HMF - Reaktion auf.

Die Bildung braun gefarbter wasser-unlöslicher Pigmente, verbunden mit einem gleichzeitigen pH-Abfall, macht sich bei längerer Reaktionsdauer bemerkbar.

Die Farbintensität reiner wässriger HMF-Lösungen steigt mit fallendem pH und wird durch Spuren von Kupferionen beschleunigt.

Cyclische, neutrale Aminosäuren (DL-Phenylalanin, L-Tyrosin, L-Prolin und DL-Tryptophan) bräunen eine HMF-Lösung schneller als vergleichbare aliphatische Aminosäuren (DL-Alanin, DL-Valin und DL-Serin). Enthalten erstere neben dem Benzolring oder an dessen Stelle einen heterocyclischen Fünfring, so wird diese Eigenschaft noch verstärkt. Ähnliches gilt von den basischen Aminosäuren L-Lysin, L-Arginin und L-Histidin. Das Bräunungsvermögen

von L-Asparaginsäure und L-Glutaminsäure ist mit Ausnahme des basischen Histidins und des neutralen Cystins stärker als das aller anderen untersuchten Aminosäuren ausgeprägt. Die langerkettige L-Glutaminsäure bräunt weniger stark als die L-Asparaginsäure.

Fremdionenzusätze wirken beschleunigend oder hemmend auf die Farbvertiefung wässriger L-Glutaminsäure-HMF-Lösungen ein.

Bei einer Ionenkonzentration von 3×10^{-5} mol. beschleunigen Magnesium, Mangan, Kupfer, Eisen und primäres Natriumphosphat die Bräunungsreaktion, während sie Zinn, Titan und Natriumhydrogensulfid hemmen. Die Farbvertiefung oder aufhellung ist abhängig von der Konzentration des Fremdionenzusatzes und nimmt mit steigender Konzentration derselben zu.

Im wässrigen Histidin-D-Glukose-System ist die pH-Depression und die Bräunungsgeschwindigkeit von der Sauerstoffanwesenheit im Reaktionsgefäß abhängig. Unter aeroben Bedingungen nimmt die Acidität der Testlösung schnell zu als unter anaeroben; die Farbvertiefung der untersuchten Reaktionslösungen dagegen verläuft sich umgekehrt.

Trennung und Nachweis der bei der Bräunungsreaktion von Glykokoll und HMF auftretenden Reaktionsprodukte

Elektrophoretische Trennung

Die Auftrennung mit Hilfe der Hochspannungselektrophorese ist nicht geeignet, eine vollständige Trennung der untersuchten Lösung herbeizuführen. Sowohl in Richtung Kathode als auch Anode erhält man verschmierte braungefärbte Pigmentzonen.

Papierchromatographische Trennung

Hiermit gelingt eine zufriedenstellende Auftrennung. Es wird zweidimensional aufsteigend getrennt (Fließmittel:

1. n-Butanol : Athanol : Wasser = 40 : 11 : 19

2. n-Butanol : Dimethylformamid : Wasser = 2 : 11 : 1).

Daneben kommt die Rundfilter-Chromatographie zur Anwendung (Fließmittel: n-Butanol : Wasser : Äthanol : Dimethylformamid = 115 : 56 : 22 : 17).

Von den verwendeten Nachweisreagentien spricht nur e i n - d e u t i g Anilinphthalat (HMF) und Ninhydrin an. Letzteres reagiert mit einer Reine auf dem Chromatogramm isolierter aber unbekannter Verbindungen unter Bildung gefärbter Komplexe.

Mit Hilfe der angegebenen Methoden gelingt eine Auftrennung der dunkelbraun gefärbten Reaktionslösung in ihre einzelnen Komponenten. Es zeigt sich, daß mit zunehmender Reaktionszeit die Zahl der erkennbaren und aufgetrennten Pigmentzonen wächst.

Die gebildeten Faropigmente sind bei den angegebenen Bedingungen wasserlöslich und reagieren auf Lackmus sauer. Mit höherer Temperatur und wachsender Reaktionszeit werden sie sowohl in Wasser als auch in verdünnten Säuren unlöslich.

Im Rundfilterchromatogramm werden im UV-Licht stark fluoreszierende Zonen beobachtet. Es wird festgestellt, daß die Zahl der Zonen mit wachsender Reaktionszeit abnimmt.

Die Bildung von HMF in Hexose-Lösungen

In reinen Hexoselösungen (D-Glukose und D-Fruktose) ist die Bildung von HMF vom Säuregrad der Lösung abhängig. Gleichzeitig ist damit ein pH-Abfall verbunden. In allen untersuchten D-Fruktoselösungen übersteigt der Betrag an HMF bei weitem den von D-Glukoselösungen.

Gepufferte Hexoselösungen erleiden für die Dauer des Versuchs keine Änderung ihrer Acidität. Aus den Versuchsergebnissen geht hervor, daß in der Reihenfolge der Anionen: Citrat, Biphtalat und Phosphat die Bildung von HMF unter gleichen Reaktionsbedingungen begünstigt wird.

Die Anwesenheit individueller Aminosäuren in Hexoselösungen beschleunigt die Bildung von HMF. Die Reihenfolge der beschleunigenden Wirkung von der Aminosäuren DL-Alanin, DL-Valin, DL-Iserin und L-Lysin ist in den beiden Testlösungen verschieden.

Es wird an einer L-Glutamin- D-Glukoselösung gezeigt, daß die Menge des gebildeten HMF vom Säuregrad der Lösung abhängt.

Von stark saurer Lösung ausgehend, fallen die HMF-Werte schnell ab, durchlaufen bei pH 3,55 ein Minimum und nehmen mit zunehmendem pH nur unwesentlich zu. Ein ähnlicher Kurvenverlauf erhält man bei reinen D-Glukose und D-Fruktose-Lösungen.

Verändert man bei gleichbleibender D-Glukosekonzentration die Menge an zugesetzter Aminosäure (L-Glutaminsäure), so erkennt man, daß auch mit steigender Konzentration derselben die HMF-Werte ansteigen.

Mechanismen und kinetische Studien

Es wird der Versuch unternommen, nachzuweisen, daß der experimentell verfolgte Reaktionsablauf eines Zucker-HMF-Aminosäure-Systems durch ein hypothetisch angenommenes, mathematisch abgeleitetes Reaktionsschema beschrieben werden kann.

Die Arbeitsmethode wird erklärt und eine allgemeine Einführung in den postulierten Reaktionsablauf gebracht. Durch eine geeignete Wahl der Ausgangskonzentration wird der Reaktionsverlauf vereinfacht.

Die Sättigungskonzentration einiger schwer löslicher Aminosäuren wird bei 70° C in Abhängigkeit von der Zeit bestimmt. Da sich diese in ausreichend kurzer Zeiteinstellt, kann die beschriebene Arbeitsmethode zur Untersuchung kinetischer Studien herangezogen werden.

Der gelöste Stickstoff wird nach der Methode von van Slyke und Kjeldahl bestimmt. Zu Beginn liefern beide Methoden die gleichen Werte; Abweichungen treten erst im späteren Verlauf der Reaktion auf. Die volumetrische Bestimmung erfasst nur die durch Säuren (Eisessig) hydrolysierbaren Umsetzungsprodukte. Stabilere Verbindungen werden daher nicht berücksichtigt, die Methode ergibt zu niedrige Werte.

Die van Slyke-Methode zur Bestimmung von Aminostickstoff in einem L-nistidin-, D-Glukose-, und DL-Tryptophan-HMF-System ergibt bereits zu Reaktionsbeginn zu niedrige Werte.

Bei einem Vergleich der Reaktionsfähigkeit verschiedener Carbonylverbindungen mit individuellen Aminosäuren kommt man zu folgendem Ergebnis:

Bei 70° C und in einem pH-Bereich von 3,15 - 4,75 reagieren weder D-Glukose noch D-Fruktose mit L-Asparaginsäure, L-Glutaminsäure, DL-Tryptophan, DL-Phenylalanin, L-Tyrosin und L-Leucin.

Diese Aussage bestätigt die Annahme, daß in saurem Gebiet die Maillard Reaktion nicht auf einer Umsetzung der glykosidischen Gruppe von D-Glukose und D-Fruktose mit der Aminogruppe einer Aminosäure beruht bzw. durch sie eingeleitet wird. Die Hexose tritt als zweiter Reaktionspartner gegenüber der Aminoverbindung n i c h t in Erscheinung.

Das saure Umwandlungsprodukt aus Hexosen dagegen, das 5-hydroxymethylfurfurol, reagiert in eindeutiger Weise unter Bildung braungefärbter Produkte, die in dieser Arbeit als Schiffische Basen bezeichnet werden.

Aus den Abbildungen erkennt man deutlich die Übereinstimmung des experimentell gefundenen Reaktionsablaufs mit dem theoretischen. Der Temperatureinfluß auf die Reaktionsgeschwindigkeit ist beträchtlich.

Die Geschwindigkeitskonstanten K_1 (Bildung der Schiffischen Base), K_2 (teilweise reversibler Zerfall der Schiffischen Base) und K_3 (irreversibler Zerfall der Schiffischen Base) werden mit Hilfe der experimentell gefundenen Werte berechnet.

Die Anwesenheit von Natriumhydrogensulfit in einem HMF-Aminosäuresystem h e m m t die Bräunungsreaktion. Das Maß der Bräunung ist direkt abhängig vom Molverhältnis der Reaktionspartner $\text{HMF} : \text{HSO}_3^-$.

Die Bräunungsgeschwindigkeit kann nicht herangezogen werden, um eine quantitative Aussage der Reaktionsgeschwindigkeit in einem HMF-Aminosäure-System zu treffen. Die Abweichung mittels der optischen Methode zu Reaktionsbeginn ist nur gering, steigt jedoch im weiteren Verlauf schnell an.

Auf Grund der vorliegenden Arbeit und ihrer Ergebnisse ist es möglich, die Bedeutung des 5-Hydroxymethylfurfurols (HMF) für die Maillard Reaktion besonders herauszustellen.

In saurem Milieu tritt beim Vorhandensein von Zuckern und Aminosäuren eine Umsetzung ein, die zu braungefärbten Produkten führt.

Es wird nun gezeigt, daß diese Bräunungsreaktion, nach ihrem Entdecker " M a i l l a r d Reaktion" genannt, erst bei Gegenwart von HMF abläuft. Die untersuchten Hexosen, D-Glukose und D-Fruktose, reagieren selbst unter den gegebenen Reaktionsbedingungen n i c h t mit Aminosäuren, mit Ausnahme des Histidins, unter Bräunungsbildung, sondern nur ihr Umwandlungsprodukt.

Setzt in einem Aminosäure-Hexose-System dennoch eine Reaktion ein, so ist diese n u r darauf zurückzuführen, daß sich aus der Hexose unter Beteiligung der Aminosäure HMF (oder HMF - ähnliche unbekannte Verbindungen) bilden. Diese "aktive" Verbindung setzt sich in einer Sekundärreaktion mit der vorhandenen Aminosäure zu braungefärbten Maillard-Reaktionsprodukten um.

Literaturverzeichnis

1. L.C. Maillard C.r.Acad.Sci.(Paris) 154, 66 (1912)
2. L.C. Maillard Ann.Chimie 5, 258 (1916)
3. F.A. Ross Adv.in Food Research 1, 257 (1948)
4. E.R. Stadtmann Adv.in Food Research 1, 325 (1948)
5. J.P. Danehy und W.W. Pigman Adv.in Food Research 3, 241 (1951)
6. J.E. Hodge J.Agr.Food Chem., 1, 928 (1953)
7. L. Gornhardt Fette, Seifen, Anstrichmittel 57, 270, 429 (1955)
8. H. Iwainsky Z.U.L., 173, 100 (1955)
9. D.T. Englis und F.A. Dykins Ind.Eng.Chem.Anal.Ed., 3, 17 (1931)
10. C. Enders Biochem.Z., 314, 389 (1943)
11. W. Diemair u.H. Fox Ber., 71, 2493 (1938)
12. D. Rogers, T.E. King und V.H. Cheldelin Proc.Soc.Exptl.Biol. Med., 82, 140 (1953)
13. L. Viswanathan und P.S. Sarma Nature 180, 1370 (1957)
14. W.E. McKeen Science 123, 509 (1956)
15. A.T. Markh Biokhimiya 21, 636 (1956)
16. B. Sorokin Ber., 19, 513 (1886)
17. F. Weygand Ber., 72, 1663 (1939)
18. R. Kuhn u.R. Ströbele Ber., 70, 773 (1937)
19. R. Kuhn u.L. Birkhofer Ber., 71, 621 (1938)
20. G.P. Ellis und J. Honeyman Advances in Carbohydrate Chem., 10, 95 (1955)
21. J.E. Hodge " " 10, 169 (1955)
22. G.P. Ellis und J. Honeyman J.Chem.Soc., 1490 (1952)
23. L. Rosen, J.W. Woods und W. Pigman J.Org.Chem., 22, 1727 (1957)
24. J.G. Erickson J.Am.Chem.Soc., 75, 2784 (1953)
25. J.F. Carson J.Am.Chem.Soc., 77, 1881 (1955)
26. C.P. Barry und J. Honeyman J.Chem.Soc., 4147 (1952)
27. F. Micheel und B. Schlieppinghoff Chem.Ber., 89, 1702 (1956)
28. A. Girard Chem.Abstacts 52, 1217 (1958)
29. G. Ågren und A. Taylor Arkiv Kemi, Mineral. Geol., 14B, no. 14, 6pp (1940)
30. K. Maurer u. B. Schied Z.physiol.Chem., Hoppe-Seyler's 213, 110 (1932)

31. F. Micheel u.A. Klemer Chem.Ber., 84, 212 (1951)
85, 1083 (1952)
32. Gottschalk, A. Biochem.J., 52, 455 (1952)
33. A. Abrams, P.H. Lowy und H. Borsook J.Am.Chem.Soc., 77, 4794 (1955)
34. P.H. Lowy u.H. Borsook J.Am.Chem.Soc., 78, 3175 (1956)
35. K.Täufel, H. Iwainsky und H. Bergner Ernährungsforschung 1, 719 (1956)
36. F. Micheel u.A.Frowein Angew.Chem., 69, 562 (1957)
37. A. Alemer u.F. Micheel Chem.Ber., 89, 1242 (1956)
38. F. Legay Compt.rend., 234, 1612 (1952)
39. I. Kawashiro Chem.Abstracts 49, 1586 (1955)
40. L.C. Maillard Compt.rend., 154, 66 (1912)
41. F.Lieben u.B. Baumiger Biochem.Z., 292, 371 (1937)
42. C.Enders Chem.Abstracts 39, 1962 (1945)
43. S.Akabori Ber., 66, 143 (1933)
44. J.Watanabe J.Biochem.(Tokio) 17, 147 (1933)
45. A.G. Zabrodskii und V.A. Vitorskaya Biokhimiya 19, 738 (1954)
46. E.F.L.J. Anet Chem.Ind. (London) 1438 (1958)
47. M.L. Wolfrom, R.C. Schlicht, A.W. Langer, Jr., und C.S. Rooney J.Am.Chem.Soc., 75, 1013 (1953)
48. L.A. Elson und W.T.J. Morgan Biochem.J., 27, 1824 (1933)
49. E. Vasseur u.J.Immers Arkiv Kemi 1, 253 (1950)
50. H.N. Horowitz, M.Ikawa u.M.Fling Arch.Biochem., 25, 226 (1950)
51. J. Immers u.E.Vasseur Nature 165, 898 (1950)
52. L.C. Maillard Compt.rend.soc.biol., 72, 599 (1913)
53. L.C. Maillard Ann.chim. (Paris) (11) 5, 258 (1916)
54. L.C. Maillard Ann.chim. (Paris) (11) 7, 113 (1917)
55. C. Enders u.K.Theis Brennstoff-Chemie 19, 360, 402, 439 (1938)
56. T.L. Tan, M.L.Wolfrom, A.W. Langer, Jr. J.Am.Chem.Soc., 72, 5090 (1950)
57. M.L. Wolfrom, L.F.Cavallieri, und D.K.Cavallieri J.Am.Chem.Soc., 69, 2411 (1947)
58. F. Kiermeyer Chem.Z., 19, 1003 (1895)
59. B.H. Webb J.Dairy Sci., 18, 81 (1935)
60. B. Bleyer, W.Diemair, F.Fischler u.K.Täufel (unter Mitarbeit von F.Arnold u.H.Tnaler) Biochem.Z., 286, 408 (1936)

- B. Bleyer, W. Diemair,
r. Fischler u. A. Türel
(unter Mitarbeit von
F. Arnold) Biochem. Z., 289, 38 (1938)
61. B. Bleyer, W. Diemair
und F. Fischler
(unter Mitarbeit von
F. Arnold u. H. Bickel) Biochem. Z., 292, 301 (1937)
62. R. Pummerer u. W. Gump Ber., 56, 999 (1923)
63. B. Singh, G. R. Dean
und S. M. Cantor J. Am. Chem. Soc., 70, 522 (1948)
64. S. I. Dulkan und
T. E. Friedemann Food Res., 21, 519 (1956)
65. J. V. Kostir und
M. Queisnerova Chem. listy 43, 2777 (1949)
Chem. Abstracts 45, 553 (1951)
66. K. Maurer Ber., 59, 827 (1926)
67. V. M. Lewis, W. B. Esselen
Jr., und C. R. Feilers Ing. Eng. Chem., 41, 2587 (1949)
68. V. A. Haas, r. H. Stadtmann
und G. Mackinney J. Am. Chem. Soc., 70, 3376 (1948)
69. G. Haugaard, L. Tumerman
und n. Silvestri J. Am. Chem. Soc., 73, 4594 (1951)
70. F. H. Stadtman
C. O. Chichester und
G. Mackinney J. Am. Chem. Soc., 74, 3194 (1952)
71. L. Grönnut u. J. Weber Biochem. Z., 121, 109 (1921)
72. Lobry de Bruyn
van Ekenstein Rec., 14, 203 (1885)
15, 92 (1896)
73. K. Bernhauer Biochem. Z., 210, 175 (1929)
74. A. Mohammad,
n. Fraenkel-Conrat und
n. S. Ulcott Arch. Biochem., 24, 157 (1949)
75. L. Rosen, K. C. Johnson
und W. W. Pigman J. Am. Chem. Soc., 75, 3460 (1953)
76. A. R. Deschreider Rev. fermentations
et inds. aliment., 2, 25 (1954)
77. a. A. R. Deschreider Rev. fermentations
et inds. aliment., 2, 111 (1954)
78. P. Pfeiffer Angew. Chem., 53, 93 (1940)
79. A. Werner Neuere Anschauungen auf dem Gebiete
der anorganischen Chemie,
Friedr. Vieweg & Sohn, Braunschweig,
1920
80. H. Diehl Chem. Reviews 21, 39 (1937)
81. G. Weitzel, n. U. Geyer
und A. M. Fretzdorff Chem. Ber., 90, 1153 (1957)

82. G.S. Bohart u.J.F. Carson Nature 175, 470 (1955)
83. H.S. Olcott u.H.J. Dutton Ind.Eng.Chem., 37, 1119 (1945)
84. R.R. Legault, W.F. Talburt,
A.M. Myline u.L.H. Bryan Ind.Eng.Chem., 39, 1294 (1947)
85. H. Kato Bull. Agr. Chem. Soc.
Japan 20, 273 (1956)
86. S. Lewin Biochem. J., 63, 14 (1956)
87. S. Lewin u. Z. Kosinski Trans. Faraday Soc., 54, 222 (1958)
88. J. Boeseken und
H. Michl Advances Carbohydrate
Chem., 189, 4 (1949)
Mh. Chem., 737, 83 (1952)
89. Th. Wieland und
G. Pfeleiderer Angew. Chem., 257, 67 (1955)
90. C. Enders Kolloid.-Z., 85, 74 (1938)
C. Enders, M. Tschapek
und R. Glawe Kolloid.-Z., 110, 240 (1948)
91. P. Brigl u. H. Grüner Ber., 66, 931 (1931)
92. E. L. Richards Biochem. J., 64, 639 (1956)
93. E. F. L. J. Anet Australian J. Chem., 10, 193 (1957)
94. A. Gottschalk und
S. M. Patridge Nature 165, 684 (1950)
95. H. G. Wagner J. Sci. Food Agr., 6, 57 (1955)
96. E. F. L. J. Anet und
T. M. Reynolds Australian J. Chem., 10, 182 (1957)
97. H. Borsook, A. Abrams
und P. H. Lowry J. Biol. Chem., 215, 111 (1955)
98. G. Drüll u. C. J. Linter Chem. Z., 19, 160 (1895)
99. A. Smirnov Stärke 1958, Jg. 10, 1
100. A. F. Korte Angew. Chem., 63, 370 (1951)
101. B. M. L. Wolfrom,
R. D. Schuetz, Liebe u.
F. Cavalieri J. Am. Chem. Soc., 70, 514 (1948)
102. L. K. Evans u. A. E. Gilliam J. Chem. Soc., 565 (1943)
103. M. L. Wolfrom, E. G. Wallace
und E. A. Metcalf J. Am. Chem. Soc., 64, 265 (1942)
104. J. Fiehe ZUL., 63, 280 (1932)
105. C. J. Kruisneer,
J. M. Vorstman und
C. E. Kniphorst ZUL., 69, 571 (1935)
106. O. Högl u. H. Sulser Mitteilungen Lebensm. Unterschn.
u. Hygiene 44, 79 (1953)
107. O. Winkler ZUL., 102, 161 (1955)
108. J. E. Hodge u. C. E. Rist J. Am. Chem. Soc., 75, 316 (1953)
109. C. Kjeldahl Houben-Weyl 2, 61 (1953)
110. D. D. van Slyke Houben-Weyl 2, 688 (1953)

Lebenslauf

Am 24. Dezember 1931 wurde ich, Erhard J u r y , als Sohn
des Molkereileiters Friedrich Jury und seiner Ehefrau
Leopoldine, geb. Bieberle, in Nieder Mohrau geboren.

Herbst 1937 - Frühjahr 1941 Volksschule in Rothfloss,
Frühjahr 1940 - Sommer 1941 Volksschule in Langeleutsch.
Besuch der Oberschule für Jungen in Mährisch Trübau vom
Herbst 1941 - Mai 1945. Arbeitszwangsverpflichtet bis
Sommer 1946; anschließend Ausweisung nach Eisenbach,
Kr. Oberburg, Bayern.

Herbst 1946 - Sommer 1951 Besuch der Oberrealschule in
Milttenberg; Abitur Juni 1951. Industriearbeiter bis Herbst
1952.

Beginn des Vollstudiums für Chemie an der Johann Wolfgang
Goethe Universität in Frankfurt.

Mai 1956 - Diplomchemiker-Vorprüfung,
November 1958 - Diplomchemiker-Hauptprüfung.

Beginn der Dissertationsarbeit am Universitätsinstitut für
Lebensmittelchemie unter der Leitung von Herrn Professor
Dr. Dr. W. Diemair.

